Collected Reprints
LIBRARY
DEC 9 1959
FISH & WILDLIFE SERVICE
1959
ND
C
B

COLLECTED REPRINTS

1958

FROM THE TOKAI REGIONAL FISHERIES RESEARCH LABORATORY

Reprints of Articles Published by Laboratory Scientists other than in the Publication of the Laboratory

東海区水産研究所業績集

昭和33年度

東海区水産研究所
東京都中央区月島3号地
昭和34年4月

この業績集は本研究所で得られた研究業績のうち、東海区水産研究所報告に発表されたもの以外のもので、年度内に学会誌などに印刷発表された業績を集録したものである。

東海区水産研究所業績集

昭和33年度

目　次

水産資源

生物

業績番号

中井甚二郎　(B—281)
紀伊半島七里御浜におけるマイワシ幼魚来游の消長（日本マイワシ資源変動に関する一資料）（英文）

阿部宗明・高島百合子　(B—289)
日本近海産サバの二型間に見られる二種の背部担鰭骨の相異に就いて（英文）

堀田秀之・阿部宗明・高島百合子　(B—290)
日本近海産サバ属魚類の頭骨に就いて

土井長之　(B—282)
サンマの資源量を推定する試み

土井長之　(B—288)
日本海西部の流刺網漁業の対象となるマイワシ資源の変動の解析と機構について

海洋

深井麟之助　(B—237)
溶在酸素の垂直分布と北西北太平洋の深層循環について（英文）

増殖

相良順一郎・簗瀬正明　(B—292)
二枚貝の環境要素としてのビタミン B_{12}—Ⅰ．アサリ、ハマグリの棲息環境及び時期によるビタミン B_{12} 含量の差異

漁具漁法

川田三郎・田原陽三・吉牟田長生　(B—238)
魚群探知機の記録から魚群の游泳速度を測定する一つの試み（予報）

業績番号

川田三郎・田原陽三 (B—293)
魚群探知機による定置網漁場における魚道の測量の一つの試み（予報）

下崎吉矩・野沢　靖 (B—284)
海水中に浸漬された糸網の強さの変化について—Ⅱ．コールタール染合成繊維網糸の強伸度と温度との関係及び海水浸漬による強さの変化

下崎吉矩・加藤春己 (B—302)
長繊維漁網糸の摩擦に対する強さ—Ⅰ

水産化学及び利用

魚介肉蛋白

右田正男・松本重一郎 (B—273)
イカ肉抽出液中の流動複屈折について—Ⅱ．水抽出液中へのミオシンの溶出（英文）

松本重一郎 (B—275)
イカ肉M-アクトミオシンの精製試料について（英文）

松本重一郎 (B—276)
イカ肉のM-アクトミオシンに関する諸知見について（英文）

右田正男・松本重一郎・青江憲道・最首とみ子 (B—277)
イカ肉ミオシン区蛋白の特異性について—Ⅰ．ミオシン区蛋白の沈澱性状の時間的変化

松本重一郎 (B—278)
イカ肉の塩類溶液よりえられるアクトミオシンについて——その調製法(英文)

松本重一郎 (B—283)
イカ肉の蛋白組成について（英文）

松本重一郎 (B—287)
イカ肉アクトミオシンの粘度に及ぼすＡＴＰの影響（英文）

右田正男・大竹茂夫 (B—291)
蛋白と色素との結合に及ぼす尿素の影響

右田正男・松本重一郎・青江憲道 (B—298)
いろいろの動物の筋肉蛋白の溶出性に関する比較的研究（英文）

青　　肉

平尾秀一・村山繁雄・簗瀬正明・山田充阿弥・菊地　嶺・田部井菊子・木坂健次
榎本吉宏 (B—299)
マグロ青肉に関する研究—Ⅰ．キワダ青肉及び正常肉のビタミンＢ群、無機質の含量

平尾秀一・村山繁雄・簗瀬正明・山田充阿弥・菊地　嶺・田部井菊子・木坂健次
榎本吉宏 (B—300)
マグロ青肉に関する研究—Ⅱ．キワダ青肉及び正常肉個体の腎臓中のビタミンＢ群、無機質の含量

業績番号

平尾秀一・村山繁雄・簗瀬正明・山田充阿弥・菊地　嶺・田部井菊子・木坂健次
榎本吉宏　(B—301)
マグロ青肉に関する研究—Ⅲ．青肉個体の簡易判別法（予報）

ビタミン

東　秀雄・村山繁雄・簗瀬正明・田部井菊子　(B—294)
魚貝類のパントテン酸含量
東　秀雄・村山繁雄・簗瀬正明・田部井菊子　(B—295)
魚貝類の葉酸含量
山田充阿弥　(B—305)
ヤツメウナギ消化管の脂質及び Vitamin A
平尾秀一・菊地　嶺　(速報・A—83)
魚皮の螢光物質フルオロデルミンについて

食品保蔵・加工

内山　均・天野慶之　(B—274)
含糖カマボコのネト形成機構—Ⅰ（英文）
内山　均・天野慶之　(B—303)
含糖カマボコのネト形成機構—Ⅱ．ペニシリウムフアニカロサムより調製したデキストラナーゼによるデキストランの判定（英文）
内山　均・田中武夫　(B—279)
魚肉ソーセージの軟化現象について—Ⅰ．軟化部分の特徴とその顕微鏡観察
横関源延・内山　均・馬見塚利明　(B—280)
魚肉ソーセージの軟化現象について—Ⅱ．軟化部位から分離された細菌について
内山　均・横関源延・本橋光太郎　(B—285)
魚肉ソーセージの軟化現象について—Ⅲ．軟化原因細菌及び数種の *Bacillus* 属による澱粉の嫌気的分解
横関源延　(B—296)
ねり製品の内部腐敗に関する研究—Ⅲ．ねり製品の酸化還元電位

原子力利用

金田尚志・酒井寿恵・石井清之助　(B—297)
γ線を照射した水産食品に含まれる油脂の性状について—Ⅰ

貝　毒

右田正男・神名孝一　(B—286)
無機塩によるアサリ毒の変質

TABLE OF CONTENTS

MARINE RESOURCES

Biology

Contribution Number

NAKAI, Z. (B—281)

Fluctuations in the fishery for young sardine off Shichiri-Mihama, Kii Peninsula. (One of the data relevant to fluctuations of the sardine stock in Japanese waters.

ABE, T. and TAKASHIMA, Y. (B—289)

Differences in the number and position of two kinds of fin-supports of the spinous dorsal in the Japanese mackerels of the genus *Pneumatophorus*.

HOTTA, H., ABE, T. and TAKASHIMA, Y. (B—290)

Notes on the head bones of the Japanese mackerels of the genus *Pneumatophorus*.

Mathematics and Statistics

DOI, T. (B—282)

A trial on estimating the abundance of population of the Pacific saury, *Cololabis saira* (BREVOORT).

DOI, T. (B—288)

On the availability of the sardine, *Sardinops melanosticta*, population caught by drift gill nets in the western Japan Sea.

OCEANOGRAPHY

FUKAI, R. (B—237)

On the deep circulation in the north-western North Pacific with reference to vertical distribution of dissolved oxygen.

AQUICULTURE

SAGARA, J. and YANASE, M. (B—292)

Vitamin B_{12} as a factor in the environment of bivalves—II. Seasonal and environmental variation of vitamin B_{12} content in *Tapes japonica* and *Meretrix meretrix lusoria*.

FISHING GEAR AND METHODS

KAWADA, S., TAWARA, Y. and YOSHIMUTA, C. (B—238)

An attempt for determining the swimming speed of fish schools by the fish finder. (Preliminary Report)

Contribution Number

KAWADA, S. and TAWARA, Y. (B—293)
An attempt for detecting the swimming course of fish schools at a set net fishing ground by fish finder. (Preliminary Report)

SHIMOZAKI, Y. and NOZAWA, Y. (B—284)
On the change in strength of netting cords immersed in the sea—II. Relation between the strength of tarred synthetic cords and the temperature, and comparison of power of these cords changing when immersed in the sea.

SHIMOZAKI, Y. and KATO, H. (B—302)
On the wear resistance in continuous filament-twines—I.

MARINE PRODUCT UTILIZATION AND CHEMISTRY

Muscle Proteins of Aquatic Animals

MIGITA, M. and MATSUMOTO, J. J. (B—273)
On the nature of the streaming birefringence observed in the aqueous extracts of squid muscle—II. Dissolution of "Myosins" in the aqueous extract.

MATSUMOTO, J. J. (B—275)
On purified M-actomyosin of squid muscle.

MATSUMOTO, J. J. (B—276)
Some notes on M-actomyosin of squid muscle.

MIGITA, M., MATSUMOTO, J. J., AOE, N. and SAISHU, T. (B—277)
On a specific behavior of "Myosins" of squid muscle—I. Precipitability of "Myosins".

MATSUMOTO, J. J. (B—278)
On actomyosin of squid muscle from salt-extract. Preparation of actomyosin.

MATSUMOTO, J. J. (B—283)
On the protein composition of squid muscle.

MATSUMOTO, J. J. (B—287)
The effect of ATP on the viscosity of squid actomyosin.

MIGITA, M. and OTAKE, S. (B—291)
Influence of urea upon the binding of some ionic dyes to proteins.

MIGITA, M., MATSUMOTO, J. J. and AOE, N. (B—298)
A comparative study on the extractability of muscle proteins of some animals.

Green Meat

HIRAO, S., MURAYAMA, S., YANASE, M., YAMADA, J., KIKUCHI, R., TABEI, K.,

Contribution Number

KISAKA, K. and ENOMOTO, Y. (B—299)
Study on the green meat of tuna—I. Quantitative differences of vitamin B group and minerals between the green and the normal meat of precooked tuna.

HIRAO, S., MURAYAMA, S., YANASE, M., YAMADA, J., KIKUCHI, R., TABEI, K., KISAKA, K. and ENOMOTO, Y. (B—300)
Study on the green meat of tuna—II. Quantitative differences of vitamin B group and minerals in kidney between green and normal bodies of yellowfin tuna.

HIRAO, S., MURAYAMA, S., YANASE, M., YAAMDA, J., KIKUCHI, R., TABEI, K., KISAKA, K. and ENOMOTO, Y. (B—301)
Study on the green meat of tuna—III. A simple method to distinguish greened body from normal one before cooking.

Vitamins

HIGASHI, H., MURAYAMA, S., YANASE, M. and TABEI, K. (B—294)
The pantothenic acid content of fish and shelefish.

HIGASHI, H., MURAYAMA, S., YANASE, M. and TABEI, K. (B—295)
The folic acid content of fish and shellfish.

YAMADA, J. (B—305)
Fat and vitamin A in the intestine of lamprey, *Entosphenus japonicus* MARTENS.

HIRAO, S. and KIKUCHI, R. (Prompt Report, A—83)
Fluorodermin, a new fluorescent hydrocarbon in the skin of fishes.

Food Preservation and Processing

UCHIYAMA, H. and AMANO, K. (B—274)
The mechanism of the slime formation on sugared Kamaboko—I.

UCHIYAMA, H. and AMANO, K. (B—303)
The mechanism of the slime formation on sugared Kamaboko—II. Identification of dextran with enzyme preparation from penicillium funiculosum.

UCHIYAMA, H. and TANAKA, T. (B—279)
The softening deterioration of fish sausage—I. Some chemical and microscopical aspects.

YOKOSEKI, M., UCHIYAMA, H. and MAMIZUKA, T. (B—280)
The softening deterioration of fish sausage—II. Microbiological studies of the softening deterioration.

UCHIYAMA H., YOKOSEKI, M. and MOTOHASHI, K. (B—285)
The softening spoilage of fish sausage—III.

Contribution Number

An anaerobic starch digestion by *Bacillus circulans* isolated from softened part of fish sausage and other *Bacillus* species.

YOKOSEKI, M. (B—296)

Studies on the internal spoilage of fish-jelly products—III.
Measurement of oxidation-reduction potential in fish-jelly products.

Peaceful Use of Atomic Energy

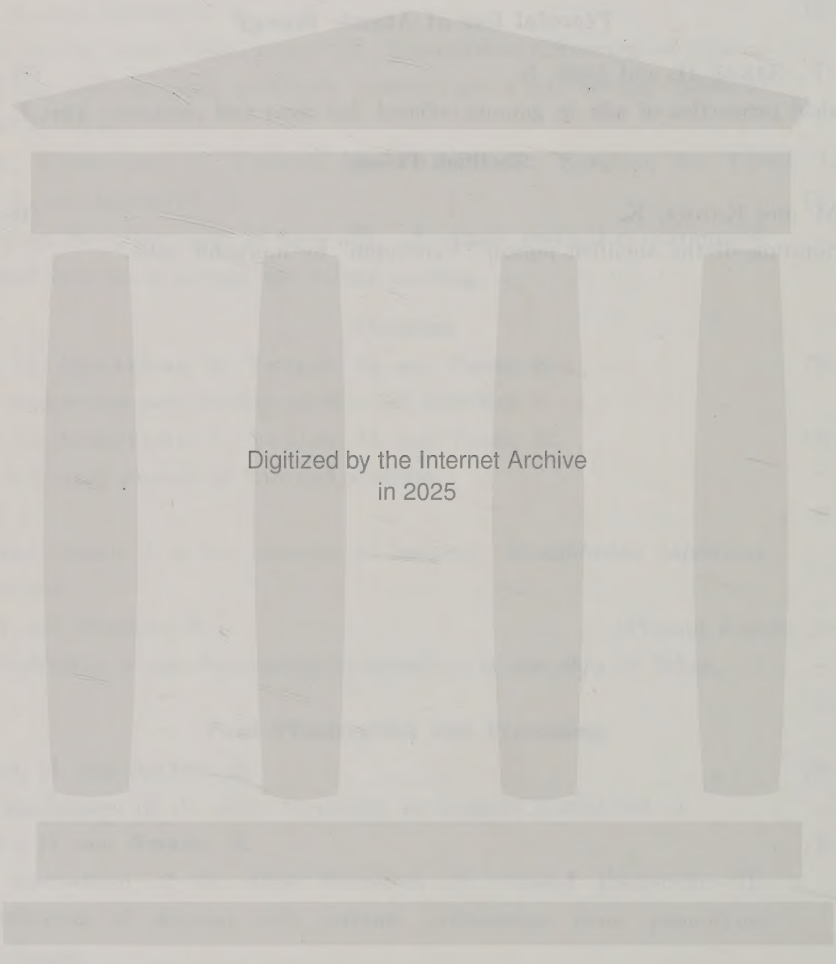
KANEDA, T., SAKAI, H. and ISHII, S. (B—297)

Chemical properties of oils in gamma-radiated fish meat and products—Part I.

Shellfish Poison

MIGITA, M. and KANNA, K. (B—286)

Deterioration of the shellfish poison "Venerupin" by inorganic salts.



Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/collected-reprints-from-the-tokai-regional-fisheries_1958_33

水　産　資　源

MARINE RESOURCES

生　　物

Biology

数　　理

Mathematics and Statistcs

Contribution B-281
Fluctuations in the Fishery for Young Sardine
off Shichiri-Mihama, Kii Peninsula

ERRATA

Page	Position	Correct	Instead of
129	Footnote	Tokyo Astron. Obs.	Tokyo Meteor. Obs.
130	Fig. 1	Kinomoto	Kinmoto
131	16th line from bottom	"kaeri"	"karei"
132	Table 1, heading	Fishing season	Fishing Season
138	Fig. 4, note	Frequency of no catch: 63% for 1925–27 86% for 1940–45 100% for 1946–49	
140	5th line from bottom	1943	1949
141	5th line	Report of preliminary investigations of fisheries (*Suisan chosa yosatsu hokoku*)	Report of fisheries investigations for prediction (*Suisan chosa yosatsu hokoku*)

Records of Oceanographic Works
in Japan. (Special Number 2)
March 1958

FLUCTUATIONS IN THE FISHERY FOR YOUNG SARDINE OFF SHICHIRI-MIHAMA, KII PENINSULA*

One of the Data Relevant to Fluctuations of the Sardine Stock in Japanese Waters

By Ziniziro Nakai

(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

Introduction

In an area south off Kii Peninsula a cold water mass prevailed with the years 1938 to 1941 as its most developed period. The phenomenon, as it was located off a cape, Shiono-misaki, was known to the people concerned as the "cold water mass off Shiono-misaki" and regarded from its expansive scale as one of the most remarkable oceanographic anomalies that had ever occurred along the Kuroshio adjacent to Japan (Uda, 1940, 1949, 1951). According to an inference proposed by Nakai (1943, 1949, 1955), this anomaly of the Kuroshio was responsible as an initial factor for a critical decrease in the catch of the Japanese sardine *Sardinops melanosticta* (Temminck et Schlegel) which began to affect sardine fisheries of the country about 1942. His inference has been based on the following.

1) In those days, a majority of sardine eggs that were born during February to March in the sea of Satsu'nan Region, the then main spawning ground for the fish off the southern tip of Kyushu, used to be transported northeastward by the Kuroshio along the Pacific coast. However, it is almost certain that the hydrographic anomaly described above impaired numbers of the developing fish larvae which were drifted to the area on their way to the northeastern destination. This is believed to have set off the initial cause of depletion in the sardine stock that took place in the Japanese waters in the recent years.

2) The decrease in the abundance, consequently, induced a

---

* Contribution B-281 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory.

change in the migratory route of the fish, with the spawning ground receding back little by little to the northwestern water off Kyushu and further to the western section of the Japan Sea. Whereas, almost all sardines ceased to come and spawn in Satsu'nan Region soon after the end of World War II.

3) Those circumstances have been persisting till now when there no longer exists the cold water mass off Shiono-misaki at all. However, it is inferable that the circumstances thus created intercepted the supply of sardine eggs and larvae to the Pacific water, inhibited this part of the ocean from contributing to the production as the major nursery ground for the Japanese sardine as it had done, and formed the secondary cause for depletion of the sardine stock. The effect was so decisive and so far-reaching as it has led the sardine fisheries on the Pacific coast to a virtual catastrophe and made it difficult for the nation's sardine stock to recover its former prosperity.

If the above inference is valid, the catch of young sardine in the neighbourhoods of Kii Peninsula, particularly in the east of Shiono-misaki, must have been abated in a close association with the oceanographic anomaly of the Kuroshio; the decrease in the local catch must have started around 1939-41 when the cold water prevailed there, then become more fatal to the fishery from 1946-47 onward, sharply reflecting the barren situation of Satsu'nan Region where the parent fish almost ceased to come and spawn. Again if these suppositions were really what happened then and there, they may possibly provide circumstantial evidences for the cause of adversity felt for years in the Japanese sardine fishery.

In an attempt at ascertaining whether or not there were such coincidences as advanced above by examining records of the local fishery for young sardine in those day, the author made field surveys at fishing villages on the Peninsula some years ago. Unfortunately, however, his attempt failed that time. One of the difficulties in obtaining first-hand information needed for the study consisted in a fact that most of documents kept by fishermen, their cooperatives or county offices had been lost in great "tsunamis", destructive waves caused by earthquakes that twice inundated the coastal area of the Peninsula, first on February 7, 1944, then on December 21, 1946*. Another impediment has been related with the fishery of the community as well as with the vernacular names of the

---

* On the day in 1944, the waves reached a height of 6 m. at Owase, and in 1946, 6.6 m. at Fukuro. (Almanac of Physical Science, 1952. Tokyo Meteor. Obs. 1951).

young sardine; existence of the fishery should have been earlier brought out of obscurity but for its operation on a small scale; the young sardine should have been known as such but for their names unfamiliar to the public.

More recently, however, in 1957, field surveys with the same aim as before were undertaken for the second time and succeeded in obtaining an amount of pertinent data, on which basis the present account has been prepared. The surveys were conducted as one of research projects in regard to productivity of the ocean and its utilization entrusted to the Japan Society for the Promotion of Science by the Japanese National Commission for UNESCO.

Here the author expresses his deep gratitude to Mr. Araya of the Society who gave him an opportunity of carrying out the present study. Earnest cooperations rendered on the occasion of the field surveys by the various people of the villages and Mr. Shigemasa Hattori, member of the Tokai Regional Fisheries Laboratory, are highly appreciated, as well.

Material and Method

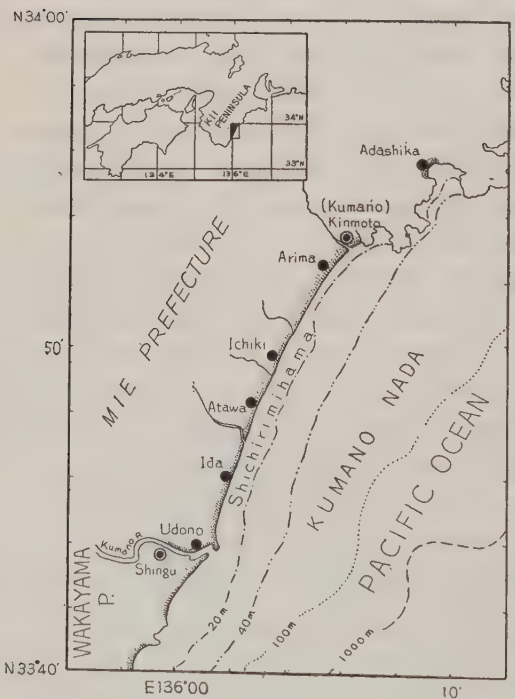


Fig. 1. Shichiri-Mihama and the neighborhoods.

The area covered by the surveys is located on the southeastern coast of Kii Peninsula, known as Shichiri-mihama, comprising fishing villages such as Kinomoto, Arima, Atawa, Ida and Udono (fig. 1). The sandy beach with shallow water extending some 20 kilometers between both ends, Kinomoto and Udono, has furnished the local community with favorable fishing conditions for beach seine operation since years back.

According to a statistical record (Bureau of Agr., Minis. Agr. Commer., 1892), the number of licensed beach seines in the community was 26 with the distribution by village as follows:

Udono	1	Arima	6
Ida	6	Kinomoto	3
Atawa	6	Adashika	1
Ichiki	3	Total	26

It is said that the number of nets and their distributions shown above have remained almost the same for more than half a century.

At the villages visited, interviews have been held with experienced fishermen and directors of fisheries cooperatives, while landing records and alike documents sought at their offices in the hope of securing information available for any conclusion. But the only materials that had been left intact from the "tsunamis" mentioned above and thus obtained so far were

A: landing book by a fisherman of Ida for one unit of seine, with entry for about seven years from May 6, 1925 to June 11, 1927 and May 18, 1940 to May 6, 1944;

B: register of landings by the Ida Fishermen's Cooperative for five seines for some six years from January 1944 to October 1949.

As is seen above, no trace of accounts had been left for the period 1928-39. Different vernacular names of fish which were made entry in the records depending on the size or developmental stage include "shirasu", larvae; "kaeri", juvenile; "kobira" specified below and "iwashi" or "yuwashi", adult; the last one being part of a compound word commonly applied to sardine; anchovy, *Engraulis japonica* (Houttuyn); and round herring, *Etrumeus micropus* (Temminck et Schlegel). Since they all but "kobira" were recorded irrespectively of the above three species, no breakdown of landings by species is possible except for "kobira", the name which is used only in this region specifically for the young sardine in a stage immediately after the metamorphosis from "karei", with the body length approximating 4-8 cm. For this reason, the examination in the forthcoming section will be made, for the time being, in pursuance of landings of the "kobira" alone.

Here it may be worth noting that these fishermen call sardine larvae "aoko" or "akahara" to distinguish them from "shirasu" by which they refer to anchovy larvae. The usage is also limited only to this region though no sardine larvae have been made entry under either name, however. Furthermore, these people used to call the anchovy "maiwashi" despite the latter denoting the sardine in all other parts of the country. Therefore it is very doubtful if they have ever identified the "kobira" in association with the "maiwashi" generally accepted for the sardine in Japan. An earlier discovery of the significant existence of beach seine fishery for young sardine off Shichiri-mihama should have been possible and likely led to substantial accounts of this particular type of fishing but for such an unusual nomenclature and the confusion involved therein.

Immigratory Season

Table 1 has been prepared on the basis of the materials A and B. It indicates the number of beach seining days by month operated for "kobira" by one unit of seine for the years prior to 1944, and by five units for the ensuing period, together with other pertinent information. Except for the months January to April 1925 and 1940 showing no data, the number of fishing days tabulated here seems to be nearly integral. Before 1946, according to the table, the fishing season or the months comprising successful days with any amount of yield was exclusively confined to April and May with the earliest gainful day having taken place on April 12, 1926, while the latest on May 29, 1940, save June 1925 when only one day had a yield. Since the locality of the fishing

Table 1. Number of Days Operated or Succeeded in Beach Seining for "Kobira".

Year		Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Fishing Began	Season Ended	Number of nets
1925	O	—	—	—	—	3*	1	0	1	1	2	10	16	May 6*	June 21	1
	S	—	—	—	—	3	1	0	0	0	0	0	0			
1926	O	2*	2	14*	20	5*	0	5	5	0	7	13	6	Apr. 12	May 17	1
	S	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0			
1927	O	8	6	7	15	7	3*	—	—	—	—	—	—	Apr. 19	May 21	1
	S	0	0	0	4	5	0	—	—	—	—	—	—			
	(No data available for the years 1928 to 1939.)															
1940	O	—	—	—	—	7	0	2	0	3	1	0	6	May 16*	May 29	1
	S	—	—	—	—	6	0	0	0	0	0	0	0			
1941	O	17	8	16*	20	11	2	0	5	6	8	9	11	Apr. 23	May 24	1
	S	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0			
1942	O	10	9	1	10	13	4	0	0	6	13	17	22	—	—	1
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1943	O	6	5	7	13	11	0	0	2	9	13	16	23	Apr. 15	Apr. 27	1
	S	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0			
1944	TO	33	34	35	22	40	12	12	3	3	13	31	22	—	May 27	5
	TS	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0			
1945	TO	0	2	45	42	33	0	0	5	13	0	22	25	Apr. 13	May 26	5
	TS	0	0	0	7	4	0	0	0	0	0	0	0			
1946	TO	30	12	0	11	0	2	0	4	6	5	27	14	—	—	5
	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1947	TO	0	0	3	19	15	8	0	13	4	12	52	12	—	—	5
	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1948	TO	29	4	3	3	3	2	0	5	5	33	16	23	—	—	
	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1949	TO	28	5	23	44	10	0	0	1	20	12	—	—	—	—	5
	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—			

—: No data available for the month.

*: Incomplete because of the records partly lost.

O: Number of days operated.

S: Number of days succeeded in fishing.

TO: Total number of days operated by the nets.

TS: Total number of days succeeded in fishing by the nets.

area, construction and efficiency of the beach seines are supposed to have remained the same throughout the periods under report, it may be reasonable to assume that the months of successful fishing represent the

Table 2—1. Daily Catch of "Kobira" Based on Document A

(Unit: Kan*)

Year	Date	Amount
1925	May 6	203
	〃 20	83
	〃 24	108
	June 21	(56)
	Annual total	450
1926	April 12	49
	〃 14	38.5
	〃 27	195
	May 4	14
	〃 8	248
	〃 17	110
	Annual total	654.5
1927	April 19	78.5
	〃 24	133.5
	〃 25	45
	〃 29	599.5
	May 5	77.5
	〃 6	48
	〃 9	48
	〃 16	196.5
	〃 21	116
	Annual total	1,342.5
1940	May 16	45
	〃 18	80
	〃 19	41.5
	〃 20	43
	〃 23	(36)
	〃 29	(42)
	Annual total	287.5
1941	April 23	97.5
	〃 27	40
	May 24	132.5
	Annual total	270
1942	May—April	0
1943	April 15	41
	〃 16	185.5
	〃 17	14
	〃 20	270
	〃 21	53.5
	〃 22	69.5
	〃 23	107
	〃 24	253.6
	〃 25	190.8
	〃 26	64.5
	〃 27	18.5
	Annual total	1,[illegible]67.9

Table 2—2. Daily Catch of "Kobira" Based on Document B

(Unit: Kan*)

Year	Date	Various units of beach seine A	B	C	D	E	Total	Average
1944	May 27	—	—	—	26	—	26	26
	Annual total	—	—	—	26	—	26	
1945	April 13	0	28	0	0	0	28	5.6
	〃 14	—	123	—	0	0	123	41.0
	〃 15	88.5	45.5	—	0	0	134	33.5
	〃 16	164.5	56	0	0	0	220.5	44.1
	〃 17	—	71.5	0	—	—	71.5	35.7
	May 7	34	0	—	—	—	34	17.0
	〃 18	0	—	327	—	—	327	163.5
	〃 26	0	108	—	0	0	108	27.0
	Annual total	287	432	327	0	0	1,046	

* One kan is approximately 3.75 kilograms.

Numerals in parentheses indicate the amounts estimated by dividing the day's proceeds with the unit price on the nearest day.

—: No fishing was operated for the day.

season when the fish immigrated into the sea off this region. With the year of 1946 as a turn of the situation, however, the fishing, no matter how frequently operated, has never been successful. This, as will be discussed later in regard to annual fluctuations in the net-day-catch, emphatically points to a serious change that likely occurred in the immigration of the young sardine, at least, to the vicinity of Ida.

Table 2 shows the amount of daily catch of "kobira" in April and May of those years (May and June for 1925); table 3, date when the operation failed completely. In table 2 one may see that on each of fifteen days the catch per net amounted to 100 kan (approx. 375 kg.) or more, and on the other five days, over 200 kan. With the use of these numbers of lucrative days, figure 2 has been drawn to present frequency of the abundant catch by 10-day intervals in which the days of each prescribed category are combined together regardless the years. It may be interesting to note in the figure that the net-day-catch over 100 kan took place during 40 days from the middle of April and that the last ten days of April had most frequently (6 times) the prolific catch despite the lack of data for April in 1925 and 1940. The richest catch per net-day

Table 3. Date When All the Nets Failed to Fish "Kobira"

May	1925	(Fishing was successful every day when operated.)
April	1926	1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 13, 15—17, 20—23, 26, 28
May	〃	1, 2 (No records are available from 18 onward.)
April	1927	6—9, 17, 18, 20, 26—28, 30
May	〃	8
.....		(No data available for the years 1928 to 1939.)
May	1940	22
April	1941	1—3, 6—9, 11, 12, 15—17, 19, 20, 24—26, 28
May	〃	2, 6—8, 11, 12, 15, 20, 21, 25
April	1942	6, 8, 10, 14, 15, 17, 18, 23, 24, 26
May	〃	2, 5, 6, 13—18, 22—24, 31
April	1943	10, 11, 13
May	〃	1, 3—5, 7, 12, 13, 23, 27, 29, 30
April	1944	1, 14—17, 21—24, 27, 30
May	〃	1, 2, 6—9, 13, 14, 20—24, 26
April	1945	7, 8, 9, 12, 21, 22
May	〃	4—6, 10, 11, 17, 20, 24, 25, 27, 28, 31
April	1946	1, 2, 7, 8, 10, 15, 16, 18, 22
April	1947	4—7, 11, 13, 16, 18, 19, 29
May	〃	5, 6, 10, 13, 14, 20, 22, 24, 27, 29
April	1948	24, 30
May	〃	1, 5, 10
April	1949	2, 7, 13—18, 21, 22, 24—26, 28—30
May	〃	4—9, 15

that was yielded during the thirteen years under consideration was about 600 kan on April 29, 1927 (table 2). Although the data so far obtained may not be very convincing us of a trend in the fishing season, the years for which the data are almost integral can be divided into two subperiods; the earlier one for 1926-27, when the fishing was prolific not only in April but in May as well, and the later from 1941 onward in which the operation tended to be concentrated in April most probably beacuse of the number of the immigrants decreasing one year after another. Particularly in 1943 when the gainful day was oftener than in any other year, the fishing was focused on thirteen days ending in April 27 inclusive of two futile days, the fact being suggestive of a marked curtailment in the immigratory season.

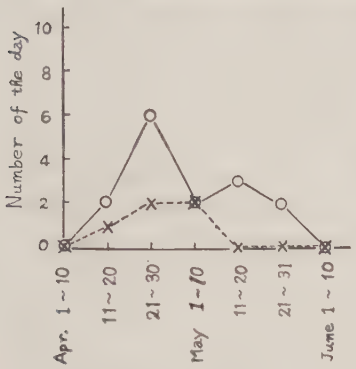


Fig. 2. Frequency of abundant catch of "kobira" by 10-day intervals. Beach seine at Ida-Mura, 1925-27 and 1940-45.

—o— Catch per net-day amounting more than 100 kan.

—x— Catch per net-day amounting more than 200 kan.

According to information given at the field interviews, the season for "kobira" belonged mostly to March and April, about a month earlier than those made entry in the landing books (see Appendix). The differences are likely attributable to inclusion by some of the fishermen in the season for "kobira" the months when the sardine larvae, "aoko" by the local name, or the juvenile, "kaeri", would make appearance to the region.

Annual Fluctuations in the Immigratory Amount

On the one hand, the present data consisting of one seine in material A and five in B, all belonging to a village, can never be warranted in perfectly representing the whole beach seines of the region numbering 26. On the other hand, topography of Shichiri-mihama as well as oceanographic conditions there is very simple; constructions of fishing gear were common among the villages with general landing trend differing little or not at all from place to place every year as far as stated by the interested parties. For these reasons, we may be justified here again, as before in discussing the immigratory season, to regard the present data as an index to fishing conditions of the region under study, while taking the above circumstances into account.

Before dealing with the annual fluctuations in the immigratory abundance on the basis of yield, changes, if any, in fishing efficiency during

the periods have to be considered. Nevertheless, as far as the period 1925-49 is concerned, there are reasons to believe that the efficiency remained nearly constant throughout the years. For the design and size of the beach seine in the region have been modified but little since 1920's up to now. Here it may be convenient to summarize specifications of gear and their changes on the basis of information that were given by the fishermen and will appear in Appendix. Until 1927 or so the so-called "genuine net" made of cotton or hemp had been in service for the wing. Then the material was substituted with rice straw. The length of the wing was 200-300 ken on each side (1 ken approx. 1.5 meters in the fishery denomination). More recently, since "kobira" were lost sight of, some of the fishermen extended their wing net for a length of about 500 ken on each side to operate for anchovy. The bag, made of cotton net, 9 piles, 25 stretch knots per unit length of *c.a.* 15 cm., or spliced net, had a length from mouth to cod-end of 15-25 ken.

Based on the landings by one seine prior to 1944 and by five there-

Table 4. Monthly Catch of "Kobira" and Catch per Net-Day
(Unit: Kan)

Year	Catch by month			Annual	Catch per net-day				Number
	April	May	June	total	April	May	June	Average	of nets
1925	—	394	56	450	—	131	56	112	1
1926	283	372	0	655	14	74	0	26	1
1927	837	506	0	1,343	55	72	0	61	1
—	(No data available for the years 1928 to 1939.)								
1940	—	288	0	288	—	41	0	41	1
1941	138	133	0	271	7	12	0	9	1
1942	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1943	1,268	0	0	1,268	91	0	0	51	1
1944	0	26	0	26	0	0.6	0	0.4	5
1945	577	469	0	1,046	14	14	0	14	5
1946	0	0	0	0	0	0	0	0	5
1947	0	0	0	0	0	0	0	0	5
1948	0	0	0	0	0	0	0	0	5
1949	0	0	0	0	0	0	0	0	5

Note: 1. Up to the present (1957) no catch has been made since 1950, either.

2. Catch per net-day has been computed for 1925 by

$$\frac{\text{total catch in the season}}{\text{number of days operated in May and June,}}$$

for the other years, by

$$\frac{\text{total catch in the season}}{\text{number of days operated in April and May,}}$$

and for the years 1944 onwards, by

$$\frac{\text{total catch in the season}}{\text{number of days operated by all the nets.}}$$

3. One kan is approximately 3.75 kilograms.

Table 5. Frequency of "Kobira" Fishing by Weight-Intervals of Catch per Unit Effort in April and May

Weight-intervals of catch per unit effort (Kan*)	1925—27 period Frequency	%	1940—45 period Frequency	%	1946—49 period Frequency	%
0	32	62.7	191	85.5	105	100.0
1— 50	5	9.8	18	8.1	0	
51—100	5	9.8	6	2.7	0	
101—150	4	7.8	2	0.9	0	
151—200	2	3.9	4	1.8	0	
201—250	2	3.9	0	0	0	
251—300	0	0	2	0.9	0	
301—350	0	0	0	0	0	
351—400	0	0	0	0	0	
401—450	0	0	0	0	0	
451—500	0	0	0	0	0	
501—550	0	0	0	0	0	
551—600	1	2.0	0	0	0	
Total	51	99.9	223	99.9	105	100.0

* One kan is approximately 3.75 kilograms.

after, table 4 gives the monthly catch, annual total, catch per net-day and so forth. The catch per unit effort in a month has been computed by dividing total with the number of days operated in the corresponding month; that of a year by dividing the annual catch with the annual total of days operated in the corresponding year; the total number of days operated by five seines being used in computing the net-day-catch for the years from 1944 onward. In figure 3 showing fluctuations in the net-day-catch by year, the values plotted for 1925-27 are all higher than 20 kan, whereas most of the intermediate six years 1940-45 indicate the values less than 10 kan, though there are comparatively copious catches as in 1940 and 1943. Particularly in 1942 and 1944 the catch per unit effort is very low or nothing at all as if to warn total futile years that ensued 1946. Now let us see in table 5 and figure 4 frequency percentage of the catch per effort in April and May,

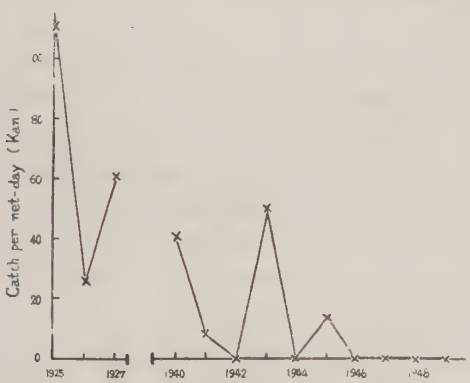


Fig. 3. Fluctuations in the amounts of catch per net-day in "kobira" fishery. One kan is approximately 3.75 kilograms.

$$\frac{\text{frequency of occurrence}}{\text{total of days operated}} \cdot 100,$$

arranged by 50-kan-intervals for subperiods 1925-27 and 1940-45; the table including one more period 1946-49. In the earlier period the frequency in all the class-intervals is higher than that in the intermediate period, while the frequency of futile

fishing days is on the increase one period after another until it reaches 100% in 1946-49 (note of figure 4)

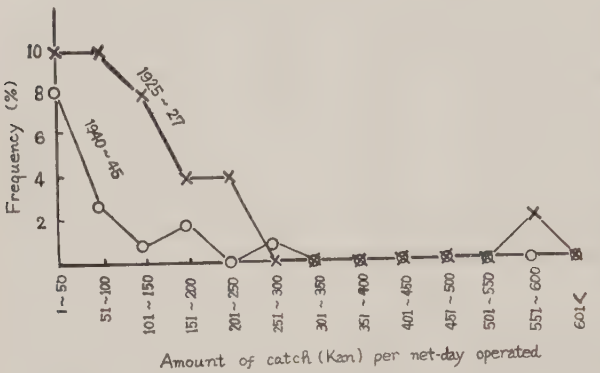


Fig. 4. Frequency of "kobira" catch per net-day by amount-intervals in April and May. Beach seine at Ida-Mura, 1925-27 and 1940-45.

Frequency of no catch
63% for 1925-27
86% for 1940-45
100% for 1946-49

One kan is approximately 3.75 kilograms.

From the above, the catch per effort by year as well as the frequency of catch by weight-class-intervals is supposed to reveal general tendency in immigratory fluctuations of "kobira" during the periods under survey because of the reasons explained at the beginning of this section. In reiterating, the immigration of "kobira" to this region was the most abundant during 1925-27, then showed a very sharp undulation depending on year during 1940-45. The accosting fish, though not so scarce in one year as in another, but anyway were on the decrease as a whole until at last they completely disappeared from the region after 1946. According to oral reports by the fishermen, the amounts of catch were generally greater than those indicated above (Appendix). As yet, except negligible discrepancies in a few years, annual trend of fluctuations in the catch is in a close agreement between the two forms of report, one narrated by them, and the other described here.

In short, the three periods sorted in connection with the cold water off Shiono-misaki and the sardine spawning in Satsu'nan appear to present an interesting correspondence to the periods classifiable in regard to the undulation in the "kobira" fishery off Shichiri-mihama.

Conclusion

When a cold water mass was prevailing off Shiono-misaki prior to 1946, the amount of landings and the duration of season for beach seine fishery off Shichiri-mihama, Mie Prefecture, pursuant to materials A and B, evidently point to a general decline in the amount of young sardine or "kobira" immigrating into the sea off the region, although they were sometimes relatively plentiful and not so nil as at other times. However, from about 1946 onward when the parent sardine are supposed to have

nearly stopped coming and spawning in Satsu'nan, the young completely disappeared from this area, as well. The facts are suggestive of close relationships that must have existed between the "kobira" immigrating into the area, the cold water mass, and vicissitudes of the sardine spawning in Satsu'nan, conforming with the hypotheses advanced as in Introduction.

Before confirming appropriate laws and mechanisms governing these relationships, however, further studies have to be made on the basis of the past and future records of "kobira" fishing, spawning conditions over the pertinent areas, especially distribution and migration of the parent, young and eggs, oceanographic and biological environments. Nevertheless, the facts enumerated above do not seem to contradict, at least in appearance, against the hypotheses proposed in regard to causes of fluctuations in the Japanese sardine stock. Instead, they likely warrant the possibility for furnishing one of circumstantial evidences in support of the hypotheses. Furthermore, if these suppositions are proved fundamentally relevant to the true mechanisms and laws governing the stock, it will be feasible to regard the beach seine situation for "kobira" as one of indices to the undulation in the Japanese sardine stock. Therefore, the fishery aiming at the young sardine off the region may be expected to recover its former prosperity only when the parent fish come back to their old spawning water in Satsu'nan—which is probably one of the prerequisites for the Japanese sardine stock to be restored in their abundance.

Summary

1. The aim of the present study is to investigate fluctuations in immigration of the young sardine, *Sardinops melanosticta* (Temminck et Schlegel) to the waters off Shichiri-mihama on the southeastern coast of Kii Peninsula (fig. 1). The study, it is hoped, may contribute to the knowledge of relationship between a cold water mass once prevailing in an area of Kumano-nada and vicissitudes of spawning activities of the sardine in Satsu'nan Region off the southern end of Kyushu.

2. Nowhere else but in the region under study, the young sardine around 4-8 cm in body length are called "kobira". Because of this unfamiliar name and because of a limited scale of the fishery, no substantial accounts have been given to the fact that the young forms, immigrating there, did support the fishery; left still more obscure were fluctuations in the landings of the one that should have been identified as the young sardine. In addition, most of statistical records kept at the villages were lost in great "tsunamis" the fishermen were suffered from

in 1944 and again in 1946. Therefore, the first approach to the investigation was a direct search for pertinent documents and first-hand information at the villages.

3. In the result, daily records of landings by beach seines at Ida for the periods May 1925 to June 1927, and May 1940 to October 1949, were obtained.

4. Pursuant to these documents, fishing season in the years before 1941 was nearly limited to April and May with the peak taking place around the last ten days of April. After a change occurred in the catch later, the season did not last so long as before and tended to end prior to May (tables 1-3 and fig. 2).

5. Let us have, for the time being, three periods of the years, 1925-27, 1940-45, and 1946-49, in regard to the fishing under study. The catches of the young fish in the intermediate period showed fluctuations from year to year more markedly than in the earlier period, with the amount getting smaller on the whole until there was no catch at all in the last period. The fishermen of the villages state that the total failure of the fishing resulted from that evident change in the situation has been persisting in the region up to the present time (tables 4, 5 and figs. 3, 4).

6. In the earlier period the Kuroshio flowed, as has been known, along its normal course through the waters adjacent to the region, while in the intermediate period a cold water mass was prevailing in Kumano-nada. In the last period under study the sardine ceased to immigrate into Satsu'nan for spawning. The fact that those phenomena occurred almost coincidently with depletion in the fishery for young sardine off the region seems to suggest, at least in appearance, relations that likely existed among them.

Mechanisms and laws governing these relations remain to be examined in future. However, if there really existed such relations between the phenomena as assumed here, immigration and production of the young sardine in the vicinity of Kii Peninsula may be expected to come back only when the parent fish return to the former spawning ground in Satsu'nan—which is probably one of the prerequisites for the sardine stock in Japanese waters to be restored in their abundance.

Literature Cited

Nakai, Z.

1949. Summary of results from *iwashi* resources investigation with reference to causes of the fishing adversity (*Iwashi shigen chosa kekka no gaiyo to furyo gen'in ni tsuite*) Proc. 3rd Subcommit., 7th Commit., Council of Science and Technology. (In Japanese).

1949. Why no more sardine? (*Iwashi wa naze torenai*). Quartery Review of

Fisheries (*Suisan Kikan*) No. 2. (In Japanese).

1955. Fluctuations in the distribution of sardine due to oceanographic conditions in the Far East. IPFC/C55/Tech 21 (Misc), 6th Session, Tokyo.

Bureau of Agr., Minis. Agr. Commer.

1892. Report of fisheries investigation for prediction (*Suisan chosa yosatsu chosa hokoku*) No. 3. (In Japanese).

Uda, M.

1940. Recent oceanographical anomaly in the Kuroshio Area, South of Honshu, and its relationship to fisheries (*Kinnen Honshu Nankai Kuroshio ryueki ni okeru kaikyo no ijo to gyokyo tono kankei*). Rept. Imper. Fish. Exp. St., No. 10. (In Japanese).

1949. On the correlated fluctuation of the Kuroshio current and the cold water mass. Oceanogr. Mg., Vol. 1. No. 1.

1951. On the fluctuation of the main stream axis and its boundary line of Kuroshio. J. Oceanogr. Soc., Vol. 6, No. 4.

APPENDIX

Account of Field Interviews on the "Kobira" Beach Seine Fishery Off Shichiri-mihama

In May 1957 when field surveys were undertaken in regard to a work reported in the text, interviews were held with experienced fishermen at the villages visited. Amounts of information given at that time, as they seem to be helpful for understanding a general picture of "kobira" fishery, may be worth being summarized below. Admittedly, numerical values, years and so forth referred to by the fishermen do not necessarily agree with those in the text since their statements have been made without checking these points, one by one, against documents. Inaccurate as some of them may be, these data will be used as they are in compiling the fishermen's oral statements for cross references. The age appearing in parentheses after the name of a person introduced is as of 1957.

Z.N.

Interview at Ida

Mr. Toraichi Uehira (59),
Former Director of the Ida Fishermen's Cooperative:
Mr. En'ichi Nakamichi (67):

Before 1925 the amounts of "kobira" immigrating into the sea had been much greater than those in 1925-35 even though the catch in the later period was fairly thrifty. But the catch started to abate off about 1941-42, and no yield has been made since the end of War (1945). In the thriving years 1933-34, the net-day-catch weighed several thousands of kan (1,000 kan=3.75 metric tons) by a normally large seine, and 3,000 kan by a small one. Occasionally, total landings by six units of seine amounted more than 10,000 kan a day. During the season from the end of March to June, the fish used to come ashore in the evening.

Referring to gear construction, the bag made of spliced net had a length from month to cod-end of about 15 ken (1 ken approx. 1.5 meters in the fishery denomination). The wing, which had been made of cotton net or the like, was substituted by rice straw net from 1921 onward. (Another party of the village remembers the date to be 1917). The length of the wing was about 300 m., and the total length of a seine, 800 m., both on each side.

Interview at Atawa—I

Mr. Kozo Enomoto,
Director of the Atawa Fishermen's Cooperative:
Mr. Keizo Sakaguchi:

Prior to 1908 the yield was not so great as later, despite the fish coming ashore, because of deficient structure of the gear. Since then till 1926 there were copious catches every year, with a greater part of landings being disposed of for farm use. Particularly in 1919 and 1925-26, the fishing thrived with a normal yield ranging from 800 to 1,000 kan a net a day. It was interesting to note that crowds of "kobira" rushed inshore at the beginning of May in 1940 or 41. This lasted for some ten days with the average catch amounting 1,000-2,000 kan per net-day, most of them being used for manure. But no sardine larvae or "aoko" by the local name were seen coming ashore in those days.

The yield in the season around 1943 was as good as 100-150 kan per net-day, then after 1945 not a "kobira" has been caught up to now. The peak of fishing season for "aoko" roughly fell on 17-18th of March, and that for "kobira" sometime in April in those years. Every season before 1908 large sized sardine were fished in plenty, but later the catch was made only on a few days of January and February. In the thriving years of "aoko" and "kobira", larger fish such as mackerel, jack mackerel and hairtail were caught in a great amount as they used to throng together inshore in pursuit of the young sardine. But after "kobira" disappeared from the area, they ceased to come in, either.

From about 1918, rice straw net replaced cotton for the wing of the seine.

Interview at Atawa—II

Mr. Fumihiko Shibaai (49):

Since my boy's day till about 1938 quantities of "kobira" used to be landed; then in 1939, the fishing was a complete failure. A fairly good catch we had in 1945 did not last any longer, and no trace of the fish has been seen till now. In the prosperous days, daily landings of "kobira" amounted to 1,000 kan on the average per net or 1,500 kan at best. The total catch of the season covering two months ranged usually from 10,000 to 15,000 kan. One-third of them were processed into a dried form for seasoning, the rest disposed of for manure. The season extended from March to the end of April with the middle of April as the peak when the annual festival for the village shrine was to be held. The sardine larvae known by the name "akahara" came inshore around February; then in March they were found mixed with "kaeri" or juvenile

measuring some 6 cm. The fish used to approach ashore in the evening, forming a black throng.

As for the gear, both the bag and the wing had been made of cotton or hemp through the later half of 1800's until 1915 or so, then rice stalk net was introduced for the wing, and about ten years later, spliced net came in use for the bag. The side length of the wing had been 300 ken until recently when it was extended over 500 ken for the specific purpose of catching the anchovy. In the village there are five sites for the beach seining operation; five units out of six seines are using them alternatively from one site to another, one unit always waiting for its turn to operate.

Interview at Kinomoto

Mr. Iwakichi Hamamoto (63):

Mr. Kan'ichi Hamamoto (37), his son:

The fishing for "kobira" was continuously practised from the later part of 1800's till about 1942. Although an exact amount of catch is not available, a better catch used to occur about once a year with every net landing some 500 baskets of the fish, estimated at 5,000 kan a day. With a normal day's catch amounting some 1,000 kan a net, an estimated yield of "kobira" was 15,000-20,000 kan per net-season, and 30,000-50,000 kan in a thrifty year, with the value per 10 kan ranging from 35 to 50 sen (then 100 sen approx. 50 U.S. cents) depending on market. Sometime around 1940 the net-day yield was as good as 1,000-1,500 kan. When the landings were that much, part of them was sold for manure. But since then no yield of the young fish has been made up to now.

In the season, March and April, the fishermen set out for operation in the evening when they took a sight of incoming schools of "kobira".

The measurement of the bag was 25 ken in length; the wing, 200 ken on each side; total side length, 500 ken. The bag had been made of cotton net, 9 plies, with 25 stretch knots per unit length of *ca.* 15 cm. or a mesh aperture *ca.* 1.5 cm. before it was replaced by spliced net having 6 and 4 plies for warp and woof, and 105 meshes per unit length of 34 cm.

Japanese Journal of Ichthyology
Volume VII, No. 1
June 25, 1958

Published by the **Nippon Gyogaku Shinkokai**
Tsukiji 5-chome, 1-banchi, Kyobashi,
Tokyo, Japan

Differences in the Number and Position of Two Kinds of Fin-Supports of the Spinous Dorsal in the Japanese Mackerels of the Genus *Pneumatophorus**

Tokiharu ABE and Yuriko TAKASHIMA

(2 text-figures and 4 tables)

In recent years the annual commercial fish catch by the Japanese fishermen has approached, and in 1957 exceeded, five million metric tons in weight, of which five to seven percent have been the two forms of mackerels, *Pneumatophorus japonicus japonicus* (HOUTTUYN) and *P. japonicus tapeinocephalus* (BLEEKER). Whereas the annual catches of the sardine, herring, anchovy, Pacific saury and a species of squid (*Ommastrephes sloani pacificus* STEENSTRUP), all of which once exceeded the mackerels in the amount of annual catches, fluctuate considerably from year to year, the mackerels of the two forms mentioned above, if considered together, keep steadily high ranks in the order of the annual catch records. It is remarkable that, despite the disappearance of the mackerel from off the eastern coast of Hokkaido in recent years, and despite the recent unfavorable international situation regarding the fishing grounds south of Korea, their annual catch records have been more than two hundred fourty thousand metric tons since 1952 (figure 1). Readers might be interested in the reasons why the two forms of the mackerels have been treated together without being distinguished from one another while the sardine, round herring and anchovy have recently been treated separately in the recording of annual catches by the Japanese governmental organizations. On the other hand, the senior author has been asked at times to point out clear-cut differences between the two forms by those wokers who have started studies on the mackerels for the Japanese governmental organizations. He has been to be very careful to do this, because the differences in external characters between the two forms are subject to considerable changes with advancing age and individual variation. Speaking generally, the adult of *tapeinocephalus*

* Contribution from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Series B, No. 289.

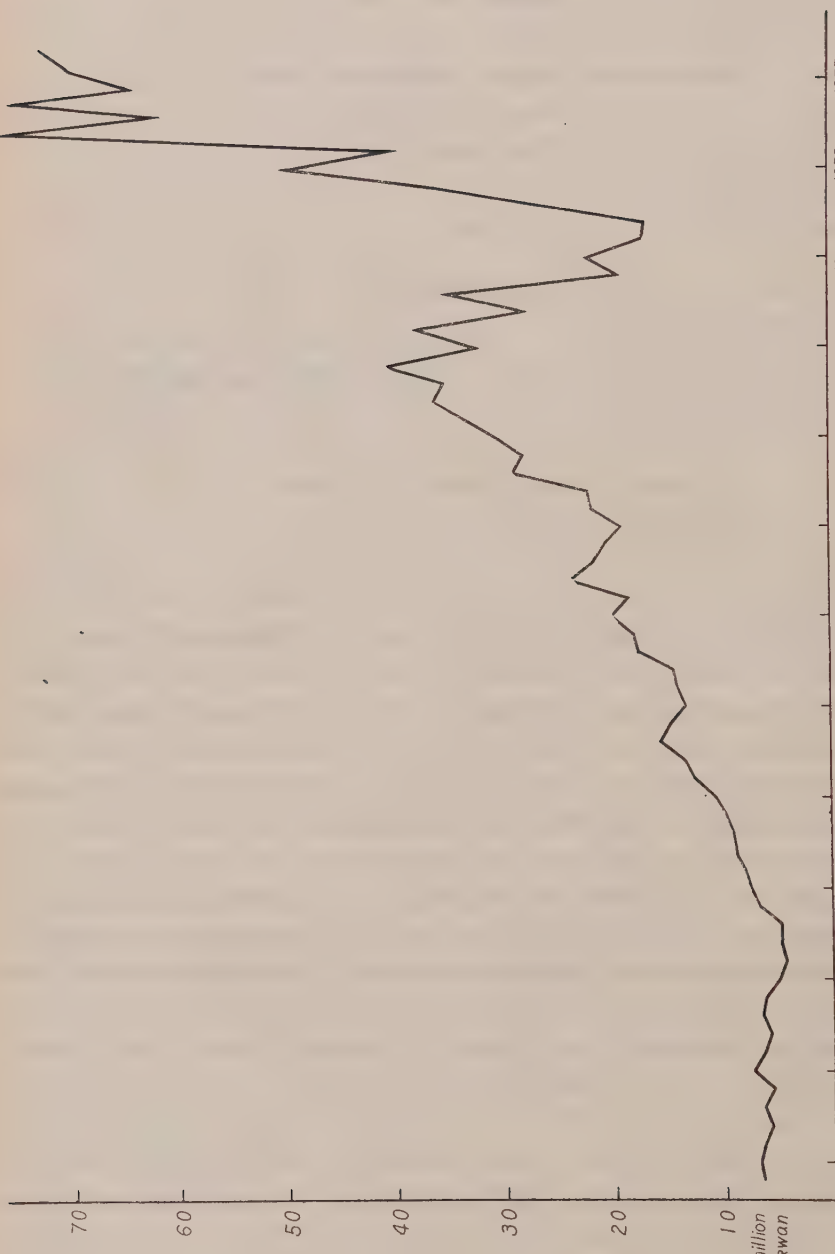


Fig. 1. Annual catch record [in 1,000,000 kwan (or *ca.* 1,000,000×15/4 kg=3,750 metric tons)] of the Janpanese mackerels [*Pneumatophorus japonicus japonicus* (HOUTTUYN) plus *P. j. tapeinocephalus* (BLEEKER)] for the years 1894—1957. The records were gathered by the Division of Statistics, Section of Economics, Ministry of Agriculture and Forestry.

第1図　日本に於けるサバ水揚量の明治27年～昭和32年間の年々の変化（単位 100万貫）.

are densely spotted ventrally, and abound warmer waters, usually not reaching beyond the Cape of Inubo (boundary between the northern and southern piscifaunal areas of Japan along the Pacific coast). This form seems rather rare in Japan Sea. The other form, *japonicus*, is usually not spotted ventrally, but examples bearing blackish or bluish spots or short lines on the lower part of the flank* are not infrequently (especially in the adult) observed, which careless observers regard as *tapeinocephalus*. *P. j. japonicus* reaches north of Hokkaido, and is taken commercially in recent years off the western coast of Hokkaido in summer. In the present paper, the writers wish to give account of the fin-supports of the spinous or first dorsal fin in the two Japanese forms of mackerels leaving accounts of differences in cranial and other characters and nomenclatorial remarks for future works; two kinds of dorsal fin-supports in these fishes, namely, proximal segments of the radials often called interneural spines by taxonomists, and the middle

Fig. 2. *Pneumatophorus japonicus japonicus* (Houttuyn) from off Katsu-ura, Chiba Prefecture. Cat. No. Abe, 58—231. Total length of body (including caudal fin) 418 mm, standard length (measured to hind end of vertebral column) 367 mm. Left-side view of the anterior half of the vertebral column, all of the proximal segments (or interneurals) of the radials of the spinous (or, 1st) dorsal (black), anteriormost three proximal segments of the radials of the soft (or, 2nd) dorsal (black), all of the middle (or, medial) segments of the radials of the spinous dorsal, and the anteriormost three middle segments of the radials of the soft dorsal.

The anteriormost middle segment of the radial of the spinous dorsal (marked with italicized Arabic numeral *1*) is V-shaped, its lateral wing on either side being a stout rod.

The subsequent middle segments of the radials of the spinous dorsal are concave dorsally, the lateral wing on either side being much expanded, and forming together a longitudinal groove receiving the dorsal spines. The hindmost middle segments (11th—13th) of the radials of the spinous dorsal become compressed and are reduced in size. The anteriormost middle segment of the dorsal radial placed just in front of the base of the 1st soft fin-ray of the 2nd dorsal differs greatly in shape from the preceding middle segments of the radials of the spinous dorsal, and is not counted in table 2. The 2nd and subsequent middle segments of the radials of the soft (or, 2nd) dorsal are single, rounded, semi-transparent cartilagnious balls, and are each clipped by the root of each half of each soft fin-ray.

第1図　ヒラサバの第1背鰭の2種の担鰭骨と第2背鰭の前方の2種の担鰭骨。第4，第5背椎骨の神経弓間にある神経棘間骨の数がヒラサバでは普通1個である事に注目され度い。

* It may be added here that the extent of the spotted area on the flank of the Japanese sardine, *Sardinops melanosticta* (Temminck & Schlegel), also varies considerabiy.

segments of the radials* (SCHMALHAUSEN, 1912; GOODRICH, 1930) which were called (and seemingly certainly so) distal segments of the radials by BRIDGE (1896), differ considerably in number and position between the two forms, and the differences are of great help in discriminating between them when external characters are not well exhibited.

A. Proximal segments of the radials (or, interneurals) of the spinous dorsal fin

It is a routine practice of the senior author to count the number of the dorsal spines for corroborating the identification of the two Japanese forms of mackerels. This number is usually higher in *Pneumatophorus japonicus tapeinocephalus* than in *P. j. japonicus* (table 1.). As might be expected from this difference between the two forms, the number of the proximal segments supporting the spinous portion of the dorsal fin (or, the first dorsal fin) is higher in *tapeinocephalus* than in *japonicus* (table 2). The number of the proximal segments of the radials supporting the soft (or second) dorsal fin, anal fin and finlets seems not to differ between the two forms.

Furthermore, the position of the proximal segments of the radials supporting the spinous portion of the dorsal fin differs considerably between them (table 3). The anteriomost proximal segment of the radial is inserted between the neunal spines of the 2nd and 3rd vertebrae in both forms, and the 2nd proximal segment is between the neural spines of the 3rd and 4th vertebrae in *japonicus* and the majority of the examples of *tapeinocephalus*. Then comes a remarkable difference between the two forms; in most cases the 3rd proximal segment alone is inserted between the neural spines of the 4th and 5th vertebrae in *japonicus* (fig. 2) whereas in *tapeinocephalus* there are usually 2 (in a few cases 1 or 3) proximal segments between these neural spines. One of the final routine practices of the senior author for corroborating the identificaton of the two forms of mackerels (when the external characters, especially the number of the dorsal spines, are not convincing) is just to cut open the left side of the anterior portion of the base of the spinous dorsal fin and to count the number of the proximal segments of the radials inserted between the neural spines of the 4th and 5th vertebrae.

The numder of the proximal segments of the spinous dorsal fin between the neural spines of the 5th and 6th vertebrae is in most cases 2 (in a few cases 1; in much fewer cases 3) in both forms. The number of the proximal segments of the radials between the neural spines of the 6th and 7th vertebrae is mostly 1 in *japonicus* (in a few cases 2 or 0), and mostly 2 (in a few cases 1) in *tapeinocephalus*. The number of the proximal segments of the radials inserted between the neural spines of the 7th and 8th vertebrae

* The senior author is indebted to Prof. Alfred S. ROMER (Museum of Comparative Zoölogy, Harvard University), Dr. H. C. GODSIL, (California Department of Fish and Game, U. S. A.) and Dr. Norman J. WILLIMOWSKY (U. S. Fish and Wildlife Service, Juneau, Alaska) for the information about the name of the bones. He wishes to express here his sincere thanks for their kindess, and takes much pleasure in stating here that he has extended his studies to the comparative study of these neglected bones (*cf.* ABE, 1957, p. 39; *Id.*, 1958, p. 1174). He overlooked the terminology proposed by SCHMALHAUSEN prioror to receipt of a letter from Prof. ROMER.

Table 1

Frequency distributions of the number of the dorsal spines (Roman numerals), dorsal soft-rays (Arabic numerals) and dorsal finlets (bold-faced Arabic numerals) in the two Japanese forms of mackerels, *Pneumatophorus japonicus japonicus* (HOUTTUYN) (ordinary figures) and *P. j. tapeinocephalus* (BLEEKER) (bold-faced figures). The material used is :

P. j. japonicus.

66 examples from Manazuru (Sagami Bay). Total length 180～330 mm. Taken by trap net during January, 1955～January, 1956.

166 examples from off south-eastern coast of Bōsō Peninsula. Total length 270～385mm. Taken by hook and line ("hanezuri") in the night of June 15～16, 1955, and July 9, 1955.

15 examples from Toyoura-machi, Yamaguchi Prefectere. Total length 65～115 mm. Collected by trap net on April 2, 1955.

13 examples from Okino-shima, Fukuoka Prefecture. Total length 250～345 mm. Taken in the night of February 10～11, 1955.

P. j. tapeinocephalus.

65 examples from Manazuru (Sagami Bay). Total length 195～285 mm. Taken by trap net on January 14, 1955, March 13～14, 1955, and January 18, 1956.

1 example from off south-eastern coast of Bōsō Peninsula. Total length 340 mm. Collected on May 11, 1956, at the Central Wholesale Market of Tokyo.

9 examples from Maese (Suruga Bay). Total length 330～350 mm. Taken on June 25, 1956.

8 examples from Nishiki, Mie Prefecture. Total length 105～115 mm. Taken by trapnet on April 22, 1954.

9 examples from near the Bonin Islands. Total length 425～450 mm. Taken by hook and line, on January 20, 1956, and early in March, 1956.

3 examples from Formosa. Total length 340～380 mm. Collected on February 25, 1956, at the market in Keelung.

第 1 表　ホンサバとゴマサバの背鰭棘数，背鰭軟条数及び背部離鰭数

Number of dorsal spines, dorsal soft-rays, and dorsal finlets	IX·12 (=ii+10)·**5**	IX·11 (=ii+9)·**6**	X·11 (=ii+9)·**5**	X·12 (=ii+10)·**5**	X·I·12 (=ii+10)·**5**	X·13 (=ii+11)·**5**	XI·11 (=ii+10)·**5**	XI·12 (=ii+10)·**5**	XII·11 (=ii+9)·**5**	XII·12 (=ii+10)·**5**	XIII·12 (=ii+10)·**5**	XIV·12 (=ii+10)·**5**
Number of examples	18	1	8	179+5*+2† **1*****	1	1+1*	1	36+3*+1**+1† **22**	**3**	**34+2**+1†**	**19+3**+1††+1†††**	**3**

* : Number of anteriormost unbranched soft fin-rays 3 or uncertain.

** : 12=i+11

*** : Number of proximel segments of radiels of spinous dorsal 10. Number of middle segments of radials of spinous dorsal 18. Number of proximal segments between the neurel spines of 3rd and 4th vertebrae 2.

† : 12=iii+9

†† : Or, XIII·11(=i+10)·**6**

††† : XI·12(ii+10)·**6**

Table 2

Frequency distributions of the number of the proximal segments of the dorsal radials (often called interneurals) (D') in the two Japanese forms of mackerels, *Pneumatophorus japonicus japonicus* (HOUTTUYN) (ordinary figures) and *P. j. tapeinocephalus* (BLEEKER) (bold-faced figures). The left figures represent numbers of D' supporting dorsal spines; the middle figures, numbers of D' supporting soft dorsal fin-rays; the right figures, numbers of D' supporting dorsal finlets. The material used is the same as in table 1.

第 2 表 ホンサバとゴマサバに於ける神経棘間骨の数

Number of D'	13+ 12+5	13+ 14+5	14+ 11+5	14+ 12+5	14+ 13+4	15+ 11+6	15+ 12+5	15+ 13+5	16+ 12+5	17+ 12+5	18+ 11+5	18+ 12+5	18+ 12+5	18+ 12+6	19+ 11+6	19+ 12+5	20+ 12+5	21+ 11+5	21+ 12+5	22+ 12+5
Number of exampls	13	1	1	101+ 1+1*	3	1	87	1	4	1*** **1**	**1**	**1**	**10**	**1**	**1**	**31+1††**	**24**	**1**	**14**	**1**

* 1st and 2nd D′ dorsally fused with one another ; counted as 2.

** 12th and 13th D′ dorsally fused with one another ; counted as 2.

*** Number of middle segments of radials of spinous dorsal (D″) 15. Number of D′ inserted between the neural spines of 4th and 5th vertebrae 1. Ridges on the right half of the skull is suggesstive of *tapeinocephalus*.

† Number of D″ 16. Number of D′ inserted betveen the neural spines of 4th and 5th vertebrae 2.

†† Hindmort 2 D′ dorsally fused with one another ; counted as 2.

Table 3

Variation in the position of the anterior proximal segments of the radials (or internuals) of the spinous (or first) dorsal fin (D') in the two Japanese forms of mackerels, *Pneumatophorus japonicus japonicus* (HOUTTUYN) (ordinary figures) and *P. j. tapeinocephalus* (BLEEKER) (bold-faced figures). The uppermost Arabic numeral in the uppermost column is the number of the anteriormost proximal segment (D') of the dorsal radial which is invariably inserted between the neural spines of the 2nd and 3rd vertebrae. The successive Arabic numerals in the same column are the numbers of D' inserted between the successive pairs of neural spines of the successive pairs of vertebrae. The material used is the same as in tables 1 and 2.

第 3 表 ホンサバとゴマサバの神経棘間骨の位置

上端のアラビア数字は第 2 脊椎骨の神経棘と第 3 脊椎骨の神経棘間にある神経棘間骨（D'）の数を示し，
以下相続く 2 個宛の脊椎骨の神経棘の間にある神経棘間骨の数を示す。

Number of D' inserted between the neural spines of 2nd and 3rd vertebrae, and those between the successive pairs of neural spines of the succssive pairs of vertebrae	1-1-1-1-2-1-1	1-1-1-2-1-1-1	1-1-1-2-1-1-2	1-1-1-2-1-2	1-1-1-2-2-1	1-1-1-3-0-1	1-1-2-1-1-1	1-1-2-2-1-1	1-1-2-2-1-2	1-1-2-2-2-1	1-1-2-2-2-2	1-1-3-1-2-2	1-1-3-1-2-2	1-1-3-2-1-2	1-2-1-2-1-2	1-2-1-2-2-1	1-2-2-1-2-1	1-2-2-1-2-2	1-2-2-2-1-2
Number of examples	1	232	9	4 **1***	1	1	3**	1†	**11**	**26**	**38**	**1**	**1**	**1**	**1**	**2**	**1**	**1**	**2**

* The specimen was in alochol since November 28, 1950, and examined in 1956. Because of the bad state of preservasion, the positions of D' were somewhat uncertain. The number of D' is 18. The number of dorsal spines and fin-rays is XI-12-**5**. The skull is somewhat suggestive of that of *japonicus* on the left side.

** In 1 specimen number of D' 14. In 2 speciemns number of dorsal spines 9 and 10, respectively; number of D' 15.

† Number of D' 14.

is 1 in *japonicus* and 2 or 1 in *tapeinocephalus*. Then, usually 1 proximal segment of the radial is inserted between each 2 neural spines of each two suceessive vertebrae till the one supporting the anteriormost fin-ray of the soft (or second) dorsal fin (and usually 2 proximal segments between each 2 neural spines ef each two successive vertebrae below the soft dorsal fin) in *japonicus*. In *tapeinocephalus* the number of the proximal segments inserted between each two vertebrae beginning with the pair of the 8th and 9th vertebrae is either 1 or 2 (and the position of the proximal segments of the radials supporting the soft dorsal fin, anal fin and finlets seems not to differ from that of *japonicus*).

B. Middle segments of the radials of the spinous dorsal fin

In so far as the present writers are aware, little attention has been paid by ichthyologists to the number and shape of the middle segments of the radials of the dorsal and anal fins in fishes. GILL (1885, p. 211) stated that "Teuthioidea are fishes distinguished by the development of transversely expanded, buckler-like, subcutaneous plates on the back, intervening between the spines, and limiting their erection forwards." His Teuthioides included *Teuthidae* (*Acanthuridae* or *Hepatidae*) and *Siganidae*. MATSUBARA (1955, pp. 964 and 965) mentioned that these plates are slightly larger than in many members of Scombroidea and that thay are not distinctly larger than in certain berycoid fishes. Soon after the commencement of the present study by the senior author in 1950, he noticed the remarkable variation in the number and shape of the middle segments of the radials of the spinous dorsal fin in the Japanese mackerels. But it was not untill 1956 that he extended his study to the comparison of the middle segments of the radials of dorsal and anal fins of varied fishes in order to understand the significance of these bones for the taxonomic study of the mackerels.

In the two Japanese forms of mackerels, the anteriormost middle segment of the dorsal radial is placed between the roots of the 1st and 2nd dorsal spines. Its shape is

Table 4

Frequency distributions of the number of the middle segments of the radials of the spinous dorsal (D'') in the two Japanese forms of mackerels *Pneumatophorus japonicus japonicus* (HOUTTUYN) (ordinary figures) and *P. j. tapeincephalus* (BLEEKER) (bold-faced figures). The middle segment of the radial just in front of the base of the 1st dorsal soft fin-ray is usually larger than, and different in shape from, preceding ones, and not included in the following counting. The material used is the same as in tables 1—3.

第4表 ホンサバとゴマサバの背部担鰭骨中節の数

Number of D''	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Number of examples	1	17	52 + * 2→	46 + 3** →	56	29	3 **5**	**10**	**24** + **1†→**	**26**	**14**	**4**

* or 12. ** or 13. † or 18.

unique among all the middle segments of the radials of the two dorsal fins and anal fin; it is an attenuated, but stiff, V-shaped bone, and its lateral wings are much narrower than in the subsequent middle segments of the dorsal radials each of which is placed just in front of a dorsal spine and concave dorsally. The size of the middle segments of the dorsal radials (hereafter abbreviated to D'') decreases from the largest 2nd one backwards, and their shape changes gradually backwards. The hinder middle segments of the dorsal radials placed between the hindmost dorsal spine and the anteriormost soft fin-ray of the 2nd dorsal are usually compressed, and devoid of lateral wings, the hindmost being at times extremely thin and small in size. As expected from the difference in the number of the dorsal spines between the two Japanese forms of mackerels, the number (table 4) and position of D'' differ between them. The number of D'' is 15 or more (up to 20) in *tapeinocephalus*, and 15 or less (down to 9) in *japonicus*. The difference in the position of D'' has not been used in the present study as a key to distnguish the two forms from one another.

Appendix

Hints to the discrimination at sea of the two forms of mackerels

1) Difference in shape of anal spine. The difference in the shape (or, strength) of the anal spine between the two Japanese forms of mackerel was first suggested* by Mr. Shoichiro Toda who helped the writers during 1953—1955. On the sea, and more especially in tagging experiment, the senior author often suffered from the injury caused by the strong spine of the anal fin of *Pneumatophorus japonicus japonicus*. The spine is not infrequently dammaged and at times shows signs of regeneration. The writers have not yet studied the change with advancing age and local variation in the shape (or, strength) of this spine, but it may be said that it is thicker, stronger and longer in *P. japonicus japonicus* than in *P. japonicus tapeinocephalus*. Tentatively, its relative length has been measured. In the former, the length of the anal spine is mostly more than 1.6% (ranging up to 2.6) of the standard length, while it is usually less than 1.5% (ranging up to 1.9% of the standard length). The measurements have been made mostly of examples more than 200 mm in total length.

2) Distance between the anterior dorsal spines. In the adult, the distance between each two spines of the anterior portion of the dorsal is smaller in *tapeinocephalus* than in *japonicus*,** and the contour of this fin also differs.

3) Color of the anterior portion of the spinous dorsal fin. In the adult, the membranes of the anterior portion of the spinous dorsal is blackish in *tapeinocephalus* and whitish in *japonicus*.

4) Groove behind the visible hindmost dorsal spine. Whenever there is a distinct groove behind the visible last dorsal spine, the senior author has dissected this part of body, and often found an extremely small spine clipped by the pair of hind projections of the middle segment

* In the key to the Indo-Australian species of *Scomber*, Dr. L. F. de Beaufort (in de Beaufort & Chapman's "The fishes of the Indo-Australian Archipelago," ix, p. 206, 1951) states that the anal spine is very feeble in *S. australis* and that it is short but strong in *S. janesaba*.

** This might be expected from the difference between the two forms in the number of the proximal segments of radials inserted between the neural spines of pairs of vertebrae. Further, the dorsal spines in the adult of *japonicus* are thicker and stronger than in *tapeinocephalus*.

of dorsal radial, in front of which is the last visible dorsal spine. In counting the dorsal spine, the presence of the distinct groove behind the hindmost dorsal spine may be regarded as a sign of the presence of an additional small spine.

References

In addition to the publications city by ABE, 1944 [Taxonomic studies on the puffers (*Tetraodontidae, Teleostei*) from Japan and adjacent regions—II. Variation of dorsal fin. Annot. Zool. Japon., xxii, no. 4, pp. 200—234, tables 1—38], the following have been consulted:

ABE, T. 1957. New, rare or uncommon fishes from Japanese waters. VI. Notes on the rare fishes of the family *Histiopteridae*. Jap. J. Ichth., vi, pp. 25—29, 71—74.

———— 1958. In TOMIYAMA and ABE's "Figures and descriptions of the fishes of Japan," lviii, pp. 1171—1178, pl. 229.

BLEEKER, P. 1854. Faunae ichthyologicae Japonicae species novae. Tijdschr. Ned. Indie, vi, pp. 395—426 (1—35).

———— 1854~57. Nieuwe nalezingen op de ichthyologie van Japan. Verh. Batav. genootsch., xxii, pp. 1—132, pls. 1—7.

DE BEAUFORT, L. F. and CHAPMAN, W. M. 1951. The fishes of the Indo-Australipelago, ix, 12 + 484 pp. Leiden.

FRASER-BRUNNER, A., 1950. The fishes of the family *Scombridae*. Ann. Mag. Nat. Hist., (12) iii, pp. 131—163.

GILL, T. N. 1885. Teleostei (In KINGSLEY, J. S. The standard natural history. Lowerverte brates, iii, pp. 98—298. Boston).

GOODRICH, E. S. 1906. Notes on the development, structure and origin of the median and paired fins of fish. Quart. Journ. Microsc. Sci, 1, pp. 333—376, p ls. 10—14.

MATSUBARA, K. 1955. Fish- morphology and hierarchy, vol. i, 2+12+790 pp., 1 pl.; vol. ii, 5+791—1606 pp., 1 pl.; vol. iii, 2+12 pp., 135 pls. In Japanese. Tokyo.

MURAKAMI, S. and HAYANO, T. 1956 On the number of interneural spines of mackerels from Japanese waters. Bull. Japan. Soc. Sci. Fisher., xxi, no. 9, pp. 1000—1006. In Japanese, with title and sum-mary in English.

SCHMALHAUSEN, J. J. 1912. Zur Morphologie der unpaaren Flossen. I. Die Entwicklung des Skelettes und der Muskulatur der unpaaren Flossen der Fische. Zeitschr. wiss. Zool., c, pp. 509—587, 4 pls.

———— 1913. Zur Morphologie der unpaaren Flossen. II. Bau und Phylogenese der unpaaren Flossen and insbesonders der Schwanzflosse der Fische. Zeitschr. wiss. Zool., civ, pp. 1—80, pls. 1 and 2.

TAMURA, O. and KO, Y. 1955. Studies on the differences between the types of *Pneumatophorus japonicus* (HOUTTUYN) and *P. tapeinocephalus* (BLEEKER)—1. Bull. Fac. Fisher. Nagasaki Univ., no. 3, pp. 107—112. In Japanese, with title and summary in English.

VEDENSKY, A. P. 1951. Materialui no biologii skumbrii iaponskii moria. Izvestia TINRO, xxxiv, pp. 47—66. In Russian.

ZAMBRIBORSHTCH, F. S. 1955. O morfologitscheskom skhodctve blizkikh vidov skombrii i biologitscheskikh razlitschiakh predeliakh vida *Scomber scombrus* L. Zool. Jurn., xxxiv, no. 4, pp. 861—868, 1 pl. In Russian.

日本近海産サバの二型間に見られる二種の背部担鰭骨の相異に就いて*

阿部宗明・高島百合子

近年我が国のサバの産額が著しく増加し，此の数年は年産数千万貫を下らない（第1図）．然し従来の漁獲統計では，我が国に分布している2型のサバ，即ちホンサバ（別名ヒラサバ）とゴマサバ（別名マルサバ）の両者を区別しなかつた為に，此の産額の増加が両者の産額の増加に依るものか，又はその一方だけの増加に依るものかは明らかでない。サバの資源生物学的研究の第1歩は此の両者の類縁関係，分布を明らかにし，又簡単な識別法を見出して，漁獲統計をホンサバ，ゴマサバに分けて行うことにあると考えられる。著者は1953年4月以来，主として関東地方の水域の材料を基とし，サバの漁況調査と平行してその魚体調査を行つて来たが，ホンサバとゴマサバの識別法に関しては漸くその研究結果の一部を公表する段階に達したと思われるに至つた。産業的に最も重要な全長 30 cm 以上のサバ類の魚体に就いては，その斑紋に依つてかなりの程度二型を識別することが出来ることは先人達の既に繰返し指摘している所であるが，之は必ずしも常に確実な範疇ではない。ホンサバにも腹部に黒斑又は黒紋があるものがあり，又ゴマサバでも腹部の斑点又は斑程明瞭でない事がある。体形に就いても，ヒラサバ，マルサバともいわれるようにホンサバはやゝ紋が左側扁し，ゴマサバは横断面が円形に近いが，之にも例外が少くなく，特に済州島方面で漁獲されたものに就いては，体形では全く区別し難いもののある事を見た。

次に背鰭棘の数の相異も従来屢々指摘された所で，之は確かに実際上便利な形質である。即ち背鰭棘数が 10 個又はそれ以下のゴマサバは先づ無いし，12個又はそれ以上のホンサバは先ず無い。只問題は 11 個のもので，之では両型を区別出来ない。而かも後方の棘は甚だ低小である事が多く，フォルマリンで固定したものでは屢々甚だ見難い。次に近年になつて言われて来た事であるが，背部担鰭骨（詳しく見ると2列ある）中，その背椎骨の神経棘間にあるもの（之を分類学者は棘間骨又は神経棘間骨といつている）の数はホンサバではゴマサバに於けるよりも概して少いが，此の場合も西日本では区別出来ぬ事があるという。著者はその数のみでなく相隣る2個の神経棘間にある神経棘間骨の数を調べたが，第4脊椎骨と第5脊椎骨の間にある神経棘間骨の数がゴマサバで2個又は3個，ホンサバでは1個であるのが普通である。そうでない場合は神経棘間骨の総数，又は他の列の背鰭担鰭骨（之の名称に就いては混乱があるが，middle segments of the dorsal radials とするのが妥当と思われる。背部担鰭骨中節と訳す）の数の違い，背鰭棘の数，体側下方の斑紋の様子，其他を総合して査定する事が出来る。

最後にホンサバとゴマサバの区別法を簡単に述べると，先づ ① 背鰭棘が 10 個又はそれ以下ならホンサバ，12 個又はそれ以上ならゴマサバ，② 11 個の時は便宜上体の左側の背鰭の前部の根元を切開いて，第4脊椎骨と第5脊椎骨の間にある神経棘間骨が1個ならホンサバ，2 個ならゴマサバ，③ 斑紋や臀鰭の棘や頭骨がゴマサバの特徴を備えていないのに上記の数が2個なら，その時はじめて背部を充分開いて神経棘間骨の総数を調べてホンサバかゴマサバかを定める。之でも決定出来ない場合は極めて稀で，通常の魚体調査に於いては斑紋，体形，臀鰭棘の形と大きさ，及び上記の ① 位で大抵区別が出来るのである。臀鰭棘は破損している事や再生したと思われる場合が少くないが，概してホンサバでは強大で，ゴマサバでは弱い。

---

* 東海区水産研究所業績 B 289 号

東北水研 研究報告
第 12 号
Oct. 1958

日本近海産サバ属魚類の頭骨に就いて※

堀田秀之（東北海区水産研究所）
阿部宗明（東海区水産研究所）
高島百合子（〃　〃）

NOTES ON THE HEAD BONES OF THE JAPANESE MACKERELS OF THE GENUS *PNEUMATOPHORUS*

By
Hideyuki Hotta, Tokiharu Abe and Yuriko Takashima

Though subject to considerable individual variation and change with advancing age, (1) the shape of the auxiliary crest near the anterior ends of the temporal and pterotic crests on either side of the skull and (2) the shape of the sphenotic differ remarkably between the adult of the two Japanese forms of mackerels, *Pneumatophorus japonicus japonicus* (Houttuyn) and *P. j. tapeinocephalus* (Bleeker).

(1) In the adult, the auxiliary crest just mentioned (a. c.) is low anteriorly and very close to the anterior portion of the temporal crest in *japonicus* while it is usually higher anteriorly and nearly parallel to the temporal crest in *tapeinocephalus*. Intergradations and examples of bilateral asymmetry in the shape of a. c. are by no means rare. Furthermore, the shape of a. c. in the adult of *japonicus* taken from northern Japan differ more markedly from that of the adult of *tapeinocephalus* (which prefers warmer waters than *japonicus*) than that of the adult of *japonicus* taken from southern Japan does. In the young of the two forms, the shape of a. c. does not differ between them and is suggestive of that of the adult of *tapeinocephalus*. The writers are inclined to regard *japonicus* to have farther differentiated than *tapeinocephalus* in northern waters.

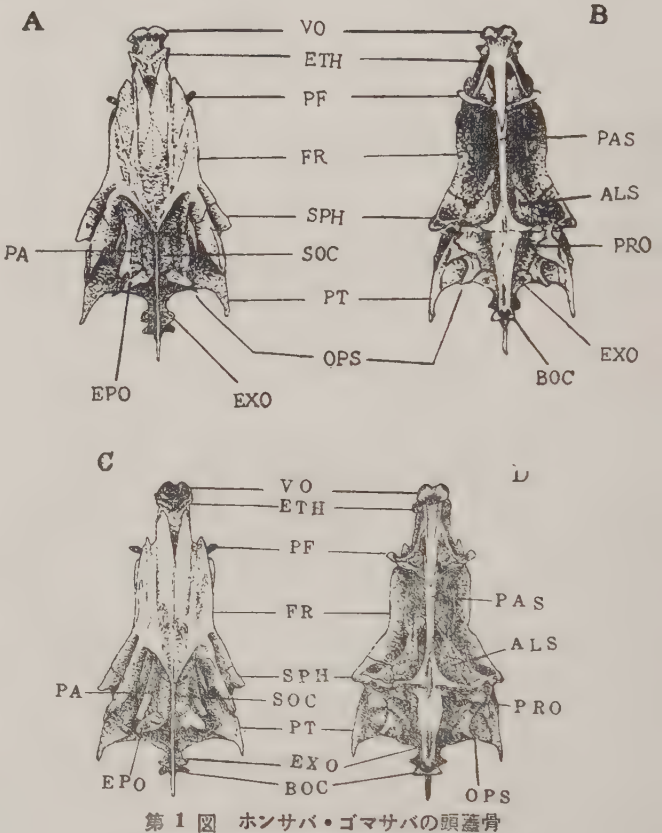
(2) The sphenotic in the adult of *japonicus* is posteriorly more sharply pointed than in the adult of *tapeinocephalus* in which the posterior margin of the bone is nearly perpendicular to the longitudinal axis of the body. In the young, the shape of the sphenotic in *japonicus* often resembles that of *tapeinocephalus* as is the case with the shape of the a. c. mentioned above.

サバ類は世界の各地で漁業の重要なる対象となつており、日本近海ではその二型、ホンサバ（別名ヒラサバ）*Pneumatophorus japonicus japonicus* (Houttuyn) とゴマサバ（別名マルサバ）*P. j. tapeinocephalus* (Bleeker) が毎年数十万貫漁獲されている。この両者の関係に就いては、学者によつては1種 (Jordan, Tanaka & Snyder '13) としたり、同一種内（田中 '34）の亜種（蒲原 '40）、或は形態的・生態的に差異をもつ2型 (Kishinouye '23) としたり、

※ 東北海区水産研究所業績第 124 号；東海区水産研究所業績番号 B 290

或は2種（田中 '17、松原 '55）に分け、魚の取引に於いても両者は別種として取り扱われたり、同一種として取扱われたりする。従来本属魚類の分類の形態的差異は主として体型・斑紋・背鰭の棘の数・第1背鰭担鰭骨の数・第1鰓弓の鰓耙数等によつていた。筆者等は本邦太平洋沿岸各地から入手した材料に基いて、頭骨に於いて之等2型のサバの間にどの様な形態上の相違があるかに就いて研究した。

本文に入るに先立ち、本研究に対して種々御便宜いただいた東北海区水産研究所長木村喜之助先生、東海区水産研究所資源部長中井甚二郎先生に深甚な謝意を表わしたい。尚材料蒐集に御協力下さつた宮城県水産試験場鈴木金吾技師、千葉県水産試験所花戸忠夫技師、東京都水産試験場五十嵐正治技師、同場小西英男技師、徳島県水産試験場加藤孝技師、同場宮崎一誠嘱託、鹿児島大学水産学部盛田友弌助教授、九州大学農学部江波澄雄教官、東北海区水産研究所海洋資源部各位、東海区水産研究所資源部鯖資源科各位に対し厚く御礼を申し述べたいと思う。



第1図　ホンサバ・ゴマサバの頭蓋骨

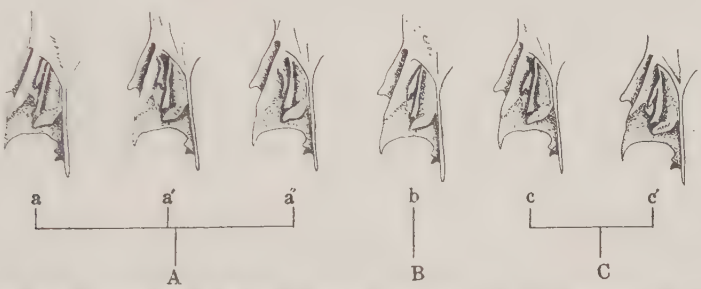
A と B ホンサバ，C と D ゴマサバ
A と C 頭蓋骨背面，B と D 頭蓋骨腹面
ALS，翼楔骨 (alisphenoid)．BOC，基底後頭骨(basioccipital)．
ETH，篩骨 (ethmoid)．EPO，上耳骨 (epiotie)．
EXO，外後頭骨 (exoccipital)．FR，額骨 (frontal)．
OPS，後耳骨 (opisthotic)．PA，頭頂骨 (parietal)．
PF，前額骨 (prefrontal)．PAS，副楔骨 (parasphenoid)．
PRO，前耳骨 (prootic)．PT，翼耳骨 (pterotic)．
SOC，上後頭骨 (supraoccipitai)．SPH，楔耳骨 (sphenotic)．
VO，鋤骨 (vomer)．

Fig. 1
A & B, Head bones of *Pneumatophorus japonicus japonicus* (Houttuyn)
C & D. Head bones of *P. j. tapeinocephalus* (Bleeker)
A & C. Dorsal view. B & D. ventral view.

サバ属魚類の頭骨の形状に就いては既に Allis (1903), Starks (1910), Kishinouye (1923), 蒲原 (1940) 及び Godsil (1954) によつて記述されている様に、頭蓋骨は長くて前方が細くなつており、後半背面には5個の隆起線がよく発達して、各隆起の間は深い凹所となつている。額骨 (frontal) の前方に細長い孔があり、額骨後部にはカツオ・マグロ類の様な三角形状の1対の孔はない。外後頭骨 (exoccipital) は大孔 (foramen-magnum) の上で左右が癒着して後方に稍々延びている。後耳骨 (opisthotic) は背面

からは見えず、只顳顬後骨 (post-temporal) との結節がよく見られるだけである。鋤骨 (vomer) に歯があり、副楔骨 (parasphenoid) は倒三角形状をなし、その中部腹面に隆起があり、その後部は動眼筋室 (myodome) の後部開口部を殆んど覆つている。ここで興味のあることは顳顬隆起 (temporal crest) の外側に短い附属隆起* (auxiliary crest) のあることで、カツオ・マグロ類の内では本属の外に近似のグルクマ属にみられるだけで、結局サバ亜科魚類に限定されていることになる。

ホンサバとゴマサバとの差異についてみると、顳顬隆起の外側にある短い附属隆起の存在様式にはかなり明瞭な違いがある。即ちホンサバでは高い顳顬隆起が低い附属隆起の上に被さる様にたつて、附属隆起の顕著な起点は殆んど額骨後縁から始まつている。之に対してゴマサバでは一般に附属隆起の高さは、顳顬隆起と同じか或はそれよりも高く、額骨後部上から顳顬隆起と平行して後方に走つている(第1図 A, C)。次に頭蓋骨腹面をみると、頭蓋側縁の楔耳骨 (sphenotic) の形状に相違がみられることは国枝 ('48, p. 183) も指摘している所である。即ちホンサバでは楔耳骨が鋭く突出しているので、その切れ刻みの彎入が深いのに対して、ゴマサバでは楔耳骨は殆んど側方に真直ぐに突出する為に、切れ刻みの彎入が浅い (第1図 B, D)。



第 2 図　サバ属の頭蓋骨背面 (左側) の顳顬隆起の外側の附属隆起に関する変異

Fig. 2. Variation in the shape of the auxiliary crest on the left side of the left temporal crest in *Pneumatophorus*.

第 1 表　ホンサバ・ゴマサバの顳顬隆起の外側の短い附属隆起の左右による相違
太字はゴマサバ

Table 1. Difference in the type of the auxiliary crest on either side in *Pneumatophorus*. Bold-faced figures are for *P. j. tapeinocephalus* (BLEEKER)

type of crest / side	A	B	C	total
左　側	**27**	**9**	**0**	**36**
left side	10	5	9	24
右　側	**26**	**9**	**1**	**36**
sight side	10	1	13	24

今この 2 点について、魚体の大きさに従つて、或はその採集地の地理的分布に従つて、上述した相違がどの様に変化するかについて吟味してみる。附属隆起の存在様式に顕著な相違があることは既に述べた通りであるが、各体長のものについて調べてみると、その様式は上述の 2 通りではなくて数種の変異が認められる。ここでは次に述べる様な理由で頭蓋骨左側の附属隆起について、その変異を表わしたものが第 2 図である。これらの変異の内 a, a′, a″ を A 型、b を B 型、c, c′ を C 型に大別して、そ

* この附属隆起は約尾叉長で 9 cm のものから出現する。

れぞれの型を決定した。同一個体に於ける左右両側の附属隆起の型は第1表に示す様に完全な左右相称ではないが、全体的にみた場合には片側だけによつても不都合はない。従つて頭蓋の左側に於ける附属隆起の状態を観察した。次にこの型が魚体の大きさや採集地によつてどの様に現われるかに就いて表わしたものが第2表である。

第 2 表　ホンサバ・ゴマサバの顳顬隆起の外側の短い附属隆起の各型の出現頻度

太字はゴマサバ

Table 2. Frequency distributions of the types of auxiliary crest.
Gothic type—*P. j. tapeinocepharus*

採集地 locality ＼ 魚体 size of fish ／ type of crest	大型魚 large-sized fish			中型魚 middle-sized fish			小型魚 small-sized fish				調査尾数 no. of examp.	尾叉長範囲(cm) range of fork-length (cm)
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	不明		
八　戸（青　森）				**18**	**7**	**30**					**55**	**24.4～29.9**
釜　石（岩　手）				**5**	**5**	**8**					**18**	**19.7～26.6**
田代島（宮　城）				**24**	**25**	**55**	**17**	**9**	**4**	**0**	104 **30**	14.3～23.6 **10.0～15.3**
勝　浦（千　葉）	15 **2**	9 **2**	47 **1**	**6**	**2**	**5**					71 **5** **13**	27.6～39.0 **29.2～31.8** **24.0～27.6**
駿河湾（静　岡）	5 **19**	12 **5**	6 **1**				**33**	**12**	**1**	**3**	23 **25** 49	28.3～33.6 **29.4～33.8** 8.0～19.2
引　田（香　川）							**16**	**7**	**1**	**0**	**24**	**13.4～15.4**
日和佐（徳　島）							**27**	**12**	**1**	**0**	**40**	**12.5～15.7**
対　島（福　岡）	17	3	17	2	1	1					37 4	36.2～41.5
枕　崎（鹿児島）				**12**	**4**	**2**					**18**	**22.5～25.7**
種ケ島（〃）	**22**	**5**	**1**								**28**	**34.0～36.8**
屋久島（〃）	**3**	**2**	**0**	**32**	**2**	**0**					**5** **34**	**35.1～38.0** **22.2～29.3**
奄美大島（〃）							**47**	**13**	**0**	**4**	**64**	**7.1～15.5**
東支那海	**18**	**7**	**1**	**8**	**2**	**0**					**26** **10**	**30.5～34.6** **23.5～25.9**
魚釣島	**17**	**7**	**1**								**25**	**29.5～34.6**

表からホンサバの大・中型魚の附属隆起の変異は、北方のものでは概してC型が多く、南方のものではA型の出現頻度が多いといつた傾向がみられ、北から南に向つてC→Aといつた傾斜が認められる。小型魚ではホンサバもゴマサバも共に殆んどがA型を示している。従つて南方性のゴマサバの附属隆起の状態は北方性のホンサバに比して、幼形的段階に於いて成体にたつたものである。次に腹面の楔耳骨の切れ刻み方について、駿河湾産のホンサバの叉長 15.0～19.2 cm の 26 尾の小型魚をみてみると、楔耳骨の後縁は体の長軸にほぼ垂直になる様に側方に真直ぐに突出し、丁度上述した成魚にみられるゴマサバの型に近いが、全部が同一ということではなくて、成魚にみられるホンサバの型とゴマサバの型の夫々の出現頻度は 9 : 17 で、前者といえどもゴマサバの型に近い。この形質もゴマサバはホンサバに比して幼形的に近い発育段階に止まつていることが判る。

従つて最初に述べた所の典型的なホンサバとゴマサバの相違の2点は地理的な変異であり、又

発育段階的な差であるということが出来るが、附属隆起の型は一度 A 型の状態を経過して後で C 型に移行していくと考えられる。即ちホンサバの幼魚から小型魚の時代にゴマサバに似た附属隆起や楔耳骨の形状の状態を経過していくであろう。従つてこの様な発生の型の相違によつて、サバ属の2型が分化して来たものだとも考えられる。

要　　約

ホンサバとゴマサバの差を頭骨の形状からみてみると、頭蓋骨背面、顳顬隆起の外側にある短い附属隆起の存在様式と頭蓋骨腹面、楔耳骨の形状の2点に纏められる。この相違は地理的な差異に相通ずるものがあり、又発生段階的な差であつて、南方性のゴマサバでは幼魚型の段階に近い発育段階に止まつている。従つて頭骨の形質からのみ見れば、ホンサバとゴマサバとの相違は明らかでない場合がある。

参　考　文　献

下記の Abe & Takashima で引用した文献以外のもののみを挙げる。

Abe, T. & Takashima, Y. (1958) Differences in the number and position of two kinds of fin-supports of the spinous dorsal in the Japanese mackerels of the genus *Pneumatophorus*. Japan. Journ. Ichth., **7** (1), pp. 1～12.

Allis (Jr.), E. P. (1903) The skull, and the cranial and first spinal muscles and nerves in *Scomber scomber*. Jour. Morph., **18**, pp. 45～328.

Godsil, H. C. (1954) A descriptive study of certain tuna-like fishes. Calif. Fish and Game Fish Bull., (97).

Jordan, D. S., Tanaka, S. & Snyder, J. O. (1913) A catalogue of the fishes of Japan. Journ. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo, vol. **33**, art. 1.

清原稔治 (1940) "鱸型族・鯖群" 日本動物分類 vol. **15**, tas. 2, no. 5.

Kishinouye, K. (1923) Contributions to the comparative study of the so-called scombroid fishes. Journ. Coll. Agr., Imp. Univ. Tokyo, **8** (3).

国枝 薄 (1948) 動眼筋室 (myodome) の変遷より見たる魚類両棲類爬虫類鳥類及び哺乳類の類縁及び分類について 日水会誌, **13** (5).

田中茂穂 (1917) 鯖の研究 (第1報) 動雑, **29** (349).

――― (1934a) 鯖の話 植物, **2** (6).

――― (1934b) 鯖の話 植物, **2** (11).

Starks, E. C. (1910) The osteology and mutual relationships of the fishes belonging to the family *Scombridae*. Journ. Morph., **21** (1), pp. 77～100.

徳田御稔 (1953) 地理的変異に於ける二つの型 生物の変異性 (岩波書店).

――― (1957) 改稿進化論 岩波全書.

サンマの資源量を推定する試み

土　井　長　之
（東海区水産研究所）

日本水産学会誌
第二十四巻　第八号　別冊
昭和三十三年十二月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, No. 8, Dec. 1958.

サンマの資源量を推定する試み

土 井 長 之
(東海区水産研究所)

A Trial on Estimating the Abundance of Population of the Pacific Saury *Cololabis saira* (BREVOORT)

Takeyuki DOI
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

Studies on the Pacific saury *Cololabis saira* (BREVOORT) mainly caught by stick-held dip nets have cleared some amounts of information of factors pertinent to formation of fishing grounds. But a treatment such as population dynamics has not been attempted for the present species because problems of the age composition or migration have not been solved perfectly till now.

In this report, the author has estimated the parameters of population such as abundance of population, natural and fishing mortality and so on under the assumptions that:

1. Variations of population are expressed as eqn. (1);
2. Natural mortality did not change so largely for recent several years;
3. Fluctuations of recruits are influenced on by oceanographic conditions.

The results of calculation by the trial-and-error method with help of the analogue computer are described as follows:

a. If instantaneous rate of natural mortality μ and efficiency of effort α are equal either to 1.0 and $\frac{1}{100,000}$, or to 0.5 and $\frac{1}{50,000}$, secular variations of catch are interpreted dynamically;

b. In the former situation, rate of exploitation and natural mortality are about $\frac{1}{4}$ and $\frac{1}{2}$. In the latter, those are $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$;

c. Survival rate is about $\frac{1}{4}$ in each situation.

The assumption 2 described above is felt uncertain. By analysis of biological informations in the survey of fishing grounds, more sufficient conclusions can be derived though calculations will become complicated.

1. 緒 言

さんま *Cololabis saira* (BREVOORT) は産卵回游魚であつて，産卵回游の途上で漁獲されるので，その年の海況特に親潮前線の状態によつて魚群の分布が変化し，漁況が大きく支配される。それだけではなく，海況は又その年の魚体の組成にも影響を及ぼし，体長組成のモードが一つであつたり，又年によつては2つあることもある[1]。漁場構造が漁業に，そして魚体組成にこのような影響を与えることは当然考えられることである。しかしそのようなサンマといえども一般的な資源研究の方法論の外に出るものではない筈てある。即ち卵や稚魚が親魚から生れ，それが商業漁獲の対象としての加入量となり，資源量となる。その間に，種

1958 年 2 月 28 日受理
東海区水産研究所業績B第 282 号

々の環境要因によつても量的な又生態的な変動や変化がおこるが，漁業も又量的な変動をおこす原因となる。従来のサンマの研究は環境要因，特に漁場についての情報が重視されていたわけである。サンマの年令組成並に春生れ秋生れ等による体長組成の変化についての生態的な性質がよく判つていなかつたことも又一般的な資源解析を困難にしている一因だと考えられる。

このような場合に，海況の影響と漁業（漁獲努力量）の影響とを分離して知り，或は加入量についての情報を知ることは特に困難ではあるが，いくつかの条件を想定してみてサンマの資源解析を試算してみたのが本報告である。言うまでもなくこれは試算であつて，資源がこのような状態にあることを説明するものではなく，このようにも考え得るということを示すだけであつて，どのような仮定が正しいかは仮定に基いてひき出した結果と，実際の変動や生態的性質とを照し合せてみて判定すべきものである。ここではその判断のための目安を提供する。比較照合する場合に抽象的な表現を以てするよりは数字で以てする方が具体的であるから，このような試算も無意味ではないと思う。

2. 計算の基にしたサンマ漁業の漁獲努力量と漁獲量

昭和 26 年から 31 年までのサンマ漁業について取扱い，漁獲量及び漁獲努力量は農林統計による数字を採用した。資源の取扱においては尾数を以て計算するのが便利であるため，漁獲重量を漁獲尾数に換算して行うべきであるが，尾数に換算しても変動の傾向には大きな変化はおこらないので，この報告では重量のままで取扱つた。だから相対的な変動を計算したと解してもよい。

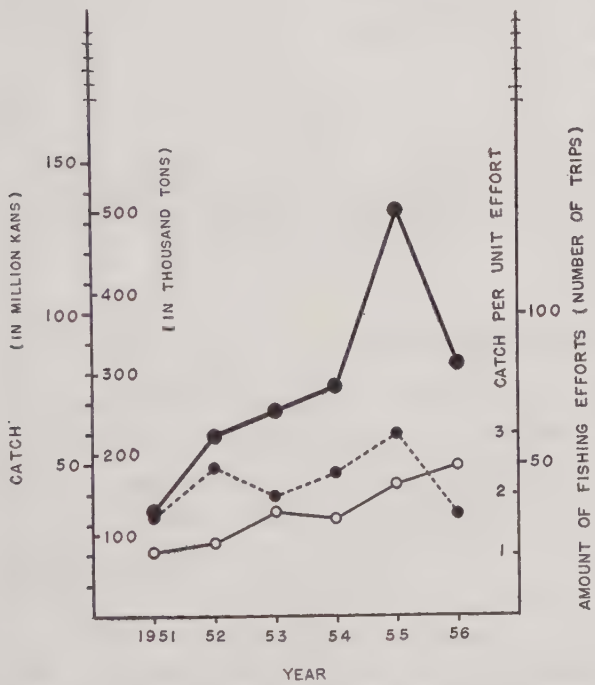


Fig. 1. Secular variations of the catch (thick solid line), the amount of fishing efforts (number of trip, fine solid line) and the catch per unit effort (dotted line) in the Pacific saury *Cololabis saira* (BREVOORT) fishery.

漁場により，魚群の密度により，漁船の大きさにより，又集魚燈や漁具の相異により同じ1航海でも資源に加える漁業の圧力は異つてくるので，漁獲努力量については精密には以上の要因を考えて有効努力量を求めなければならない。しかしこの問題はこれだけでも一つの研究項目になる性質のものであるし，目下のところはそのような精密さよりは，大体でもよいから資源の変動傾向を見極めるというねらいで，漁獲努力量は航海数をそのまま採用して計算した。サンマ漁業は目的魚種と実際の漁獲魚種とが違つたりするというようなことはないし，又底曳漁業のように混獲や魚種別のすみ分けというような問題もないので，有効努力量を精密に取扱わなかつたことによる偏りもある程度は無視されると思う。第1図に漁獲量，漁獲努力量（航海数）及び1航海あたりの漁獲量を示す。

3. 資源変動の機構について

サンマの年令組成を求めて，それに基いて資源を論じたものもあるが[2]，一般的にはサンマは目下のところ年令査定が困難のようである。このような場合の資源の取扱い方として次のような考え方をした。

漁獲努力量及び漁獲量から資源量及び加入量を推定することを目的としているのであるから，資源の変動機構としてはさしあたり“加入量及び漁獲努力量の変化に応じて漁獲量が変る”として計算上の機構の模型がつくれる。そして“加入量や努力量の年々の変化はその年の海況等に影響される”という説明をすることにすればよい。

資源量，加入量，漁獲努力量，漁獲量，生残率，自然死亡率や漁獲能率等の資源力学上の諸種の特性値についての記号，及び資源の変動法則を示すところのこれらの特性値間の関係式は次のようである。

添字 i：年 Year

P：資源量 Abundance of population

R：加入量 Recruits

X：漁獲努力量 Fishing efforts

C：漁獲量 Catch

S：生残率 Survival rate

F：漁獲率 Rate of exploitation

ϕ：漁獲係数 Instantaneous rate of fishing mortality

μ：自然死亡係数 Instantaneous rate of natural mortality

α：漁獲能率 Efficiency of unit effort

$$\left.\begin{aligned} C_i &= F_i P_i \\ P_i &= R_i + S_{i-1} P_{i-1} \\ F_i &= \frac{\phi_i}{\phi_i + \mu}\left\{1 - e^{-(\phi_i+\mu)}\right\} \\ S_i &= e^{-(\phi_i+\mu)} \\ \phi_i &= \alpha X_i \end{aligned}\right\} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

4. 計算について

前節で述べれ各種特性値のうち，判つているのは X_i 及び C_i である。これだけから (1) 式を解くことは不可能であるので，α 及び μ を色々と仮定した場合を式 (1) によつて計算してみることにする。この計算はアナログコンピューターですれば早くて便利である。α を $\frac{1}{10,000}$ から $\frac{1}{100,000}$ まで，μ を 0 から 1.0 まで変化させた場合のいくつかの組合せについての計算例を漁獲量の相対値で第 2 図に示す。

第 2 図でみると，$\alpha = \frac{1}{100,000}$，$\mu = 1.0$ 及び $\alpha = \frac{1}{50,000}$，$\mu = 0.5$ の 2 つの場合が実際の漁獲変動の傾向と合致している。それで資源変動の状態や特性値がこのような値であるとみなしてもよいことを示している。それはこのように考えても漁獲の変動をある程度説明出来るからである。

これらの場合の資源量 P_i 及び加入量 R_i を示すと第 3 図となり特性値（漁獲率，生残率及び年間自然死亡率）は第 1 表のようになる。ここで R_i の変動は海況とか生態的な加入条件などの補充機構の問題として説明すべきであつて，漁場の分析等からその情報が得られるであろう。そしてそれで説明がつくならば上述の資源分析の正しさが証明されることになるが，ここでとり上げた資料のみではこの判定は出来ない。

特性値についてみると，生残率が $\frac{1}{4}$ 程度であるので同一魚群が漁業の対象となるのは 3 ケ年にわたることはなく 2 ケ年位であることがわかる。又逸散を含めた自然死亡率は約 $\frac{1}{2}$ 又は $\frac{1}{4}$ であつて前者においては近年の漁獲率は $\frac{1}{4}$，後者は $\frac{1}{2}$ である。上にも述べたように，いづれの場合の方が真実の資源の状態に近いかはここでは判らないが，生態的或は漁場構成等の知識からこの点が解明されることが望ましい。強いて私見を述べるならば漁具能率の点等からみて前者が資源の状態に近いと思う。

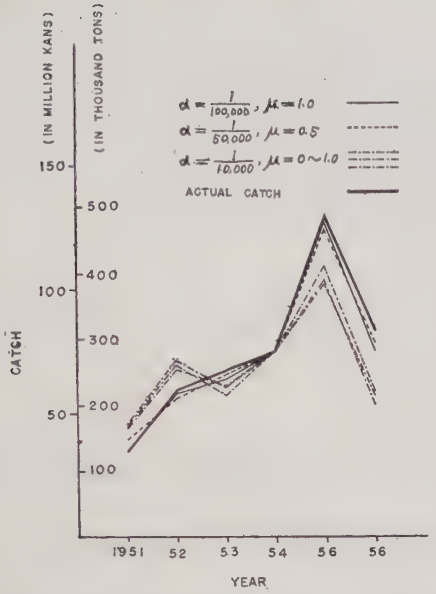


Fig. 2. Comparisons of secular variations of the actual catch of saury with calculated catches under some assumptions of efficiency of effort α and instantaneous rate of natural mortality μ.

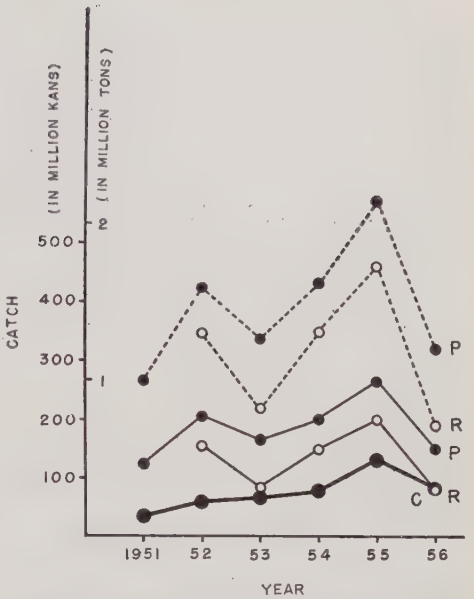


Fig. 3. Estimated abundances of population P and recruits R. Thick solid lines stand for the actual catch C. Dotted lines and fine solid lines correspond to the situation 1 and 2 in Table 1 respectively.

Table 1. Estimations of population parameters such as rate of exploitation F, survival rate S and natural mortality M. Estimating formulae and notations are shown in eqn. (1).

Situation 1 is under the assumptions that efficiency of effort α and instantaneous rate of mortality μ equal $\frac{1}{100,000}$ and 1.0. And situation 2 is under the assumptions that $\alpha = \frac{1}{50,000}$ and $\mu = 0.5$.

Year	Situation 1 assuming: Efficiency of effort $\alpha = \frac{1}{100,000}$, Instantaneous rate of natural mortality $\mu = 1.0$			Situation 2 assuming: Efficiency of effort $\alpha = \frac{1}{50,000}$, Instantaneous rate of natural mortality $\mu = 0.5$		
	Rate of exploitation F	Survival rate S	Natural mortality M	Rate of exploitation F	Survival rate S	Natural mortality M
1951	0.13	0.29	0.58	0.28	0.41	0.31
1952	0.14	0.28	0.58	0.29	0.40	0.31
1953	0.20	0.25	0.55	0.41	0.31	0.28
1954	0.18	0.26	0.56	0.39	0.33	0.28
1955	0.23	0.23	0.54	0.50	0.26	0.24
1956	0.26	0.21	0.53	0.56	0.22	0.22

5. 論議と結び

サンマの資源調査は従来は主として漁場構造論より取扱われてきているが，一般的資源論と同じように加

入量からの資源量の変動を資源力学的に取扱うことをこの報告では試みてみた。その場合，資源構造や自然死亡等について仮定をおいて試行誤差法によつて計算をしてみて，実際の漁獲変動と相対的傾向を比較して両者の傾向のかなり合つているものを現実に近い資源の状態と判断して，資源量，加入量や各種特性値を求めるという方法を採用した。サンマについては資源力学的な研究はあまり行われていないので，先ず大体の傾向をみる意味で試算を行つたものである。試行誤差法によつて求めたものであるから，絶対的なものではないが漁獲率や加入量の大きさや資源の構造の範囲の目安はあたえ得るであろう。その実証はここであげた資料のみからは求むべくもなく，他の生態的な且つ他の資源論上の根拠によらねばならない。

さて本報告での資源計算上の主な仮定は次のようなものである。

1. 資源の変動構造は式 (1) による。
2. 昭和 26 年から 31 年までの数年間は逸散も含めて年間自然死亡率に大きな変化はない。故に自然死亡係数はこの間一定とする。
3. 加入量の変動は海況等の影響による。

そして計算の結果は

a. 自然死亡係数 $\mu = 1.0$，漁獲能率 $\alpha = \frac{1}{100,000}$ か $\mu = 0.5$，$\alpha = \frac{1}{50,000}$ かの 2 つの場合が資源変動の説明がつく。

b. 前者では漁獲率約 $\frac{1}{4}$，自然死亡率約 $\frac{1}{2}$ であり後者の場合には漁獲率約 $\frac{1}{2}$，自然死亡率約 $\frac{1}{4}$ である。

c. 生残率はいづれも約 $\frac{1}{4}$ である。

仮定の 2 は疑問が多い。漁場の調査等によつて生態的なことを分析すれば，これについての詳しいことが判明し少し面倒にはなるが正確な結論が得られるであろう。

尚，アナログコンピューターの計算操作及び図表作製については嶺山美和子氏に多大の労をわずらわした。ここに深く感謝する。

文　献

1) 木村喜之助: 海況による魚群の集合・分離の一理論．第 1 報　東北海区秋季のサンマ漁場に関して，東北海区水産研究所研究報告 7，103～145 (1956).
2) 久保雄一・武藤康博: 太平洋側サンマの漁業生物学的研究—Ⅲ．年令別漁獲量について—Ⅰ．茨城県水産試験場試験報告，昭和 28 年度，56～57 (1957).

日本海西部の流刺網漁業の対象となるマイワシ資源の変動の解析と機構について

土　井　長　之
（東海区水産研究所）

日本水産学会誌
第二十四巻　第六・七号　別冊
昭和三十三年十一月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, Nos. 6 & 7, Nov. 1958

日本海西部の流刺網漁業の対象となるマイワシ資源の変動の解析と機構について

土 井 長 之
(東海区水産研究所)

On the Availability of the Sardine *Sardinops melanosticta* Population caught by Drift Gill Nets in the Western Japan Sea

Takeyuki Doi

In determining a population size in the initial period of fishing or the size of recruit, the availability will be considered as a factor playing a greater role than mortality. Unless we take the availability into consideration in our treatment, therefore, it would be sometimes difficult for us to explain the fluctuations in fish catch by combination of any other factors. In this report, we, comparing the variations in actual catches and in theoretical catches calculated from the assumed population models, have proved that the availability can be computed with the aid of an analogue computer designed for analysing population problems.

In order to postulate the mathematical models of a population, the problems concerning the sardine, *Sardinops melanosticta*, exploited by the gill nets in the west Japan Sea, have been treated as examples, because the data such as fishing effort and age composition by gear are better available for the catch in this region than in other parts of our country.

Indicated in Fig. 1 are the comparisons between the actual catches and theoretical ones that are assumed in equations (1) to (9) for various combinations of gear efficiency and natural mortality; in Fig. 3 are the comparisons for another combination assumed after the previous treatment in equation (10). Except for 1953 in Fig. 3, the patterns of theoretical catches in these figures do not fit to the actual ones in any combination of gear efficiency and natural mortality.

Therefore, we have to compute the availability by assuming the most probable values of efficiency of gear (1/100,000) and coefficient of natural mortality (0.5). In Table 1 showing the results obtained, the column A indicates the availability compared with the preceding year, and the column B series of relative availability compared on the basis of 1951. The reasons making the availability vary from year to year and the questions concerning the structures of mechanisms by which the conditions of the initial abundance of a population or recruit will be established are important problems to be solved in the future.

1. ま え が き

漁獲量の変動は一つの要因のみによつて支配されるものでなくて，初期資源量又は加入量，漁獲率，自然死亡率等の合成された影響を受ける。初期資源量が定まつてから後の漁獲率や自然死亡率の変化に対応する漁獲量の変動は理論的には取扱いは容易であるが，それらの要因の可能な範囲の組合せの影響だけでは真の漁獲量変動を説明し得ないことがおきる。その場合に初期資源量又は加入量の大小を決める要因として，来游率等であらわされることもある availavility を考慮に入れた変動機構が考えられる。この報告ではこのような場合についての検討をしてみた。

日本海西部のマイワシの流刺網漁業の漁獲物についてはその漁獲量，漁獲努力量，年令組成等が明にされ

1958 年 6 月 30 日受理
東海区水産研究所業績 B 第 288 号

ているので，資源力学的に特性値を求めたり変動機構を推測する場合には模式化することが比較的容易であろう。

2. 記　号　Notations

今，次のような記号で種々の特性をあらわすとする。

R: 加　入　量　Recruits

N: 初期資源量（尾数）　Size of population in initial period (individuals)

C: 漁獲量（尾数）　Catch (individuals)

E: 漁　獲　率　Rate of exploitation

S: 生　残　率　Survival rate

F: 瞬時漁獲係数　Instantaneous rate of fishing mortality

M: 瞬時自然死亡係数　Instantaneous rate of natural mortality

添字 i: 年　Year

X: 漁獲努力量　Number of fishing efforts

α: 漁獲能率　Efficiency of gear

3. 計算式と資源模式 1.

ある年級群を追跡する場合を考える。その第1年目の初期資源量を N_1 とすれば，第1年目にては，

$$C_1 = N_1 E_1 \quad \cdots\cdots (1)$$

$$\left.\begin{aligned} E_1 &= \frac{F_1}{F_1 + M_1}(1 - S_1) \\ S_1 &= e^{-(F_1 + M_1)} \end{aligned}\right\} \quad \cdots\cdots (2)$$

第2年目には，availability の年変化については考えないことにして，模式1として，

$$\left.\begin{aligned} N_2 &= N_1 S_1 \\ C_2 &= N_2 E_2 \end{aligned}\right\} \quad \cdots\cdots (3)$$

同じく第3年目には，

$$\left.\begin{aligned} N_3 &= N_2 S_2 \\ C_3 &= N_3 E_3 \end{aligned}\right\} \quad \cdots\cdots (4)$$

以下同様に，

$$\left.\begin{aligned} N_i &= N_{i-1} S_{i-1} \\ C_i &= N_i E_i \end{aligned}\right\} \quad \cdots\cdots (5)$$

である。E_i 及び S_i は (2) 式と同じような関係式が F_i と M_i に対して成立する。又

$$F_i = \alpha X_i \quad \cdots\cdots (6)$$

である。アナログコンピューターにて

$$C_i = N_i \frac{F_i}{F_i + M_i}\{1 - e^{-(F_i + M_i)}\} \quad \cdots\cdots (7)$$

（$N_i = 1$ とすれば C_i は E_i になる）

$$N_i = N_{i-1} e^{-(F_{i-1} + M_{i-1})} \quad \cdots\cdots (8)$$

（$N_{i-1} = 1$ とすれば N_i は S_{i-1} の値になる）

の2つの計算式をつくつておけば F_i, M_i, R_i の変化に応じた C_i, S_i, E_i, 等の値を直ちに計算することが出来る。

4. 日本海西区の流刺網漁業への模式1の適用

日本海西区の流刺網漁獲物の年級変動の分析の模式として1年魚が生残つて2年魚となつて漁獲され，そ

れが更に生残つて3年魚になるとして，available な stock には加入・逸散による変化がないとすれば，上述の模式1が成立ち，

$$\left.\begin{aligned} N_1 &= \frac{C_1}{E_1} \\ N_2 &= N_1 S_1 \\ N_3 &= N_2 S_2 = N_1 S_1 S_2 \\ &\vdots \\ N_i &= N_1 S_1 \cdots\cdots S_{i-1} \end{aligned}\right\} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (9)$$

とおける。(1) 式と (2) 式に基いて α 及び M を色々と変えてアナログコンピューターにより計算した理論上の漁獲量 C'（細い実線と点線）と実際の漁獲量 C（太い実線）とを比較したものが第1図である。資料は日本海西区の流刺網の昭和 26 年の2才魚を追跡したものである。尚，太い点線は航海数であらわした漁獲努力量である。

比較を容易にする為，C と C' の差を描けば第2図となる。如何なる場合も一致していない。即ち α や M を如何ように変化させても C と C' が一致することは困難である。即ち資源は当然のことながら available stock による出入（逸散・加入）がみとめられる。26 年級においては相対的に 3，4 年魚に大きな新加入資源があつたことが明かである。尚ここで取扱つたのは刺網による漁獲物の年令組成であるが，日本海には最近旋網漁業が進出している。このために生残率が影響を受け，F' を旋網による漁獲係数とすれば，$S = e^{-(F+F'+M)}$ となる。F' が一定ならばここに取扱つたようでよいが，そうでなければ取扱いにいくつかの考慮すべき点が生じてくる。

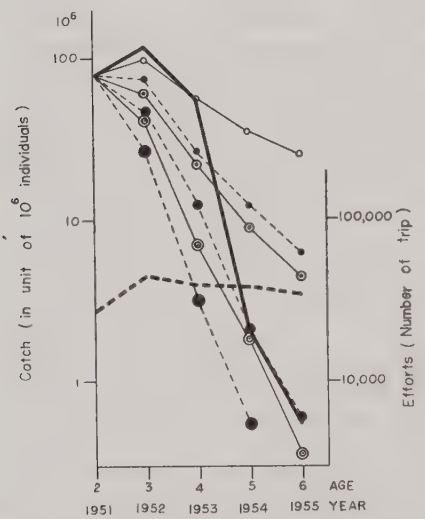


Fig. 1. Comparison of actual catch with theoretical ones under the assumption of model 1 with various values of gear efficiency (α) and natural mortality coefficient (M).
Thick solid line: Actual catch
Thick dotted line: Number of trip
—○—: Theoretical catch when
···●···: 〃 $\alpha=1/100{,}000$ $M=0$
—⊙—: 〃 $\alpha=1/50{,}000$ $M=0$
···●···: 〃 $\alpha=1/100{,}000$ $M=0.5$
—◎—: 〃 $\alpha=1/50{,}000$ $M=0.5$
···●···: 〃 $\alpha=1/100{,}000$ $M=1.0$
〃 $\alpha=1/50{,}000$ $M=1.0$

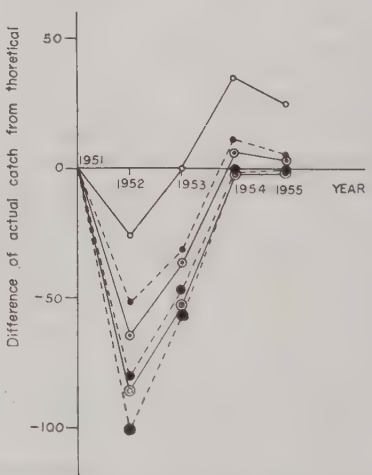


Fig. 2. Difference between actual catch and theoretical ones under the assumption of model 1.
For explanations of lines see note of Fig. 1.

5. 模 式 2

次に模式2として初期資源量は前年の推定資源量のみに影響されるとして，

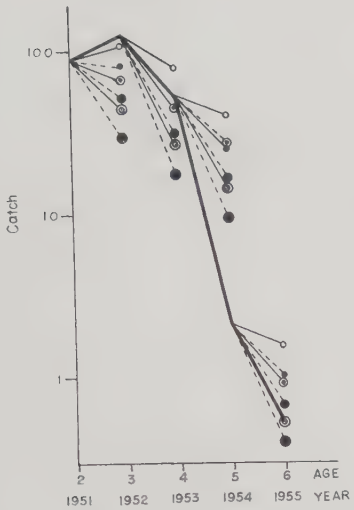


Fig. 3. Comparison of actual catch with theoretical ones under the assumption of model 2. For explanations of lines see note of Fig. 1.

Table 1. Estimated values of availability, when efficiency of gear (α) and coefficient of natural mortality (M) are assumed as 1/100,000 and 0.5 the most probable values from Fig. 3.

Year	A	B
1951		1
1952	1.63	1.63
1953	1.17	1.90
1954	0.08	0.15
1955	0.59	0.09

Column A: availability compared with one in the preceding year.
Column B: relative availability compared with one in 1951.

$$\left.\begin{aligned} N_1 &= \frac{C_1}{E_1} \\ N_2 &= N_1 S_1, \quad N_2' = \frac{C_2}{E_2} \\ N_3 &= N_2' S_2, \quad N_3' = \frac{C_3}{E_3} \\ &\vdots \\ N_i &= N_{i-1}' S_{i-1} \ . \end{aligned}\right\} \cdots\cdots (10)$$

$$\left.\begin{aligned} C_2'' &= N_2 E_2 \\ C_3'' &= N_3 E_3 \\ &\vdots \\ C_i'' &= N_i E_i \end{aligned}\right\} \cdots\cdots (11)$$

として求めた理論上の漁獲量 C'' は第3図に示す。尚，N_i' は漁獲率より算定した初期資源量であつて，$i=1$ 以外では一般に生残率よりのそれである N_i とは等しくない。

この場合にも実際の漁獲変動とは合わない。

6. availability の導入

そこで availability を導入しなければならない。即ち次のように考える。3年魚は availability が大きく4年魚は大体一致して 3，4 年魚の availability は同一と推定される。5，6 年魚は availability が減少した。

前年を1とした availability を第3図より求めると $\left(\alpha=\frac{1}{100,000},\ M=0.5\ \text{として}\right)$ 第1表のAとなり，1951年を1として年変動であらわすと第1表のBとなる。結局，模式3として availability が第1表のようであり，漁具能率が $\frac{1}{100,000}$，自然死亡係数が 0.5 位であれば漁況の説明がつく。この場合には漁況を支配する最大要因は初期資源量がどうしてあらわれるかというところにしぼられよう。

7. むすび

以上述べてきたことによつて日本海西区の流刺網漁業の対象となるマイワシの漁獲量は，漁獲率，自然死亡率の変化で受ける影響より初期資源量の変化によつて受ける影響の方が割合が大きいと推定される。2～3年魚間で実際のと合つている理論値の漁獲率及び生残率は約 0.5 及び 0.3～0.5 である。日本海西部のマイワシ資源解析の従来の結果[1]と，照し合せてみると不一致は見出されないようである。これは両者とも point estimation でなく，いずれも幅を持つて推定しているからである。この幅を縮めることが今後の研究かといえば必ずしもそうでないと思う。即ちアナログコンピューターでいくら漁獲率や生残率を変えて細部の調節をしてみても，初期資源量の変化を無視する限り漁獲変動を説明することの出来る情報は得られないのであるから，初期資源量の大小がどうしてあらわれるかを研究する方が重要だと考えられる。

尚，このような解析，あるいは改良したものが認められるならば，全国のマイワシ変動について調べて次の機会に報告したい。但しこの場合には，前にも述べたように各種の漁業が行われているのであるから，それらの漁獲努力量を標準化しなければならないので，先ず有効漁獲努力量についての研究が先決となる。

文献

1) 日本海区水産研究所：鰯資源協同研究経過報告，1957.

海　　洋

OCEANOGRAPHY

THE DEEP CIRCULATION IN THE NORTH-WESTERN NORTH PACIFIC WITH REFERENCE TO VERTICAL DISTRIBUTION OF DISSLOVED OXYGEN

By **Rinnosuke Fukai**

Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo, Japan

Reprinted from
Proceedings of the Unesco Symposium on Physical Oceanography
1955, Tokyo

THE DEEP CIRCULATION IN THE NORTH-WESTERN NORTH PACIFIC WITH REFERENCE TO VERTICAL DISTRIBUTION OF DISSLOVED OXYGEN*

By Rinnosuke Fukai

Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo, Japan

Résumé

'auteur étudie la façon dont varient du nord au sud tributions verticales de l'oxygène dissous. En utilisant nées fournies par des observations océanographiques es de juillet à novembre 1954, il a étudié les modi- s latérales du taux d'oxygène dissous sur des surfaces onstante où un mélange latéral de masses d'eau est se produire. Il ressort de cette étude que l'oxygène a tendance à s'étendre sur les surfaces σ_t=constante, sauf dans le cas de certaines couches d'eau. Cette tendance est peut être liée à la circulation profonde des masses d'eau. Toutefois, dans certains cas exceptionnels, les changements que l'on constate dans la distribution verticale de l'oxygène dissous ne peuvent s'expliquer par la seule circulation des masses d'eau: il faut également faire entrer en ligne de compte les facteurs biologiques, que l'auteur mentionne d'ailleurs à diverses reprises.

Introduction

he present author has recently pointed out in evious report (Fukai, 1954) that, as the charac- c features of the north-western North Pacific, nt materials such as phosphate and nitrate are ven in the surface, while dissolved oxygen de- s markedly with maximum gradients in the layer en 100 and 300 m., resulting in a lack of oxygen deep layer. In this case, it was suggested that the decomposition processes of dead marine organisms could be regarded as one of the factors causing the lack of oxygen.

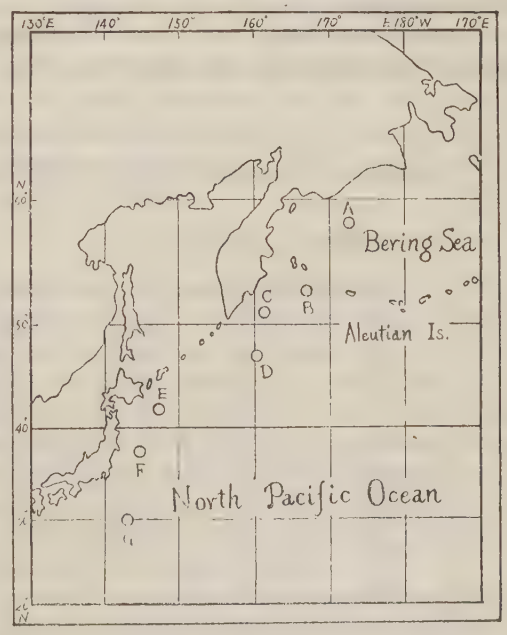
In the present report, the author has studied the process of southward changes in vertical distributions of dissolved oxygen, taking the deep circulation and the biological factor into consideration.

Results and Discussions

irst of all, the data obtained for seven stations, s, from A to G shown in Fig. 1, were selected om the materials obtined from the summer to utumn of 1954, and the attentions were paid fferences in the vertical distributions of dis- l oxygen or phosphate at these stations.

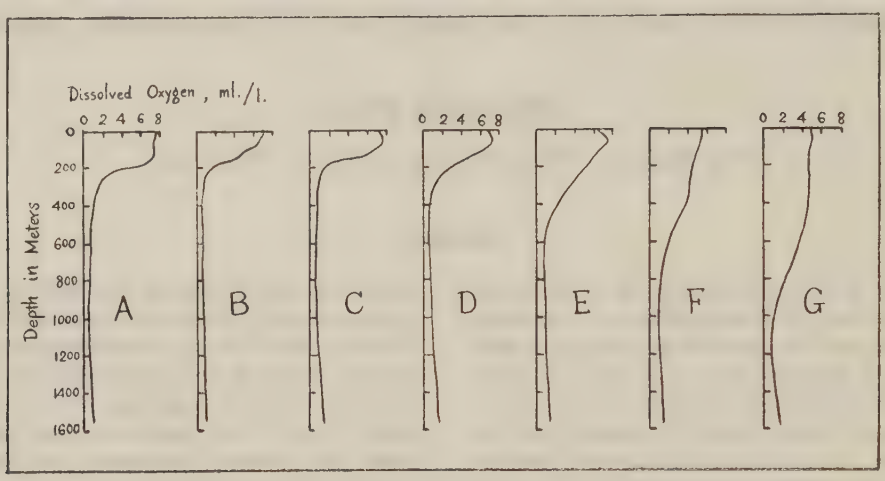
he vertical distributions of dissolved oxygen norganic phosphate at each station are shown gs. 2 and 3, respectively. Taking a view of ig. 2, it will be noticed that, in northern des between 40 and 60°N, the surface layer ins dissolved oxygen up to 8 ml per liter, as the oxygen decreases with increasing depth content of 0.5 ml, passing through a layer of n decrease. In this case, the minimum oxygen nt appears at a layer of about 1000 m or shal- . The thickness of the layer of sudden decrease y 100 m at the latitude of 50°N, while it in- s gradually as going to the south, reaching

Fig. 1. Stations under consideration.



Contribution B-No. 237 from the Tokai Regional ies Research Laboratory, Tokyo, Japan.

Fig. 2. Vertical distribution of dissolved oxygen in each station.



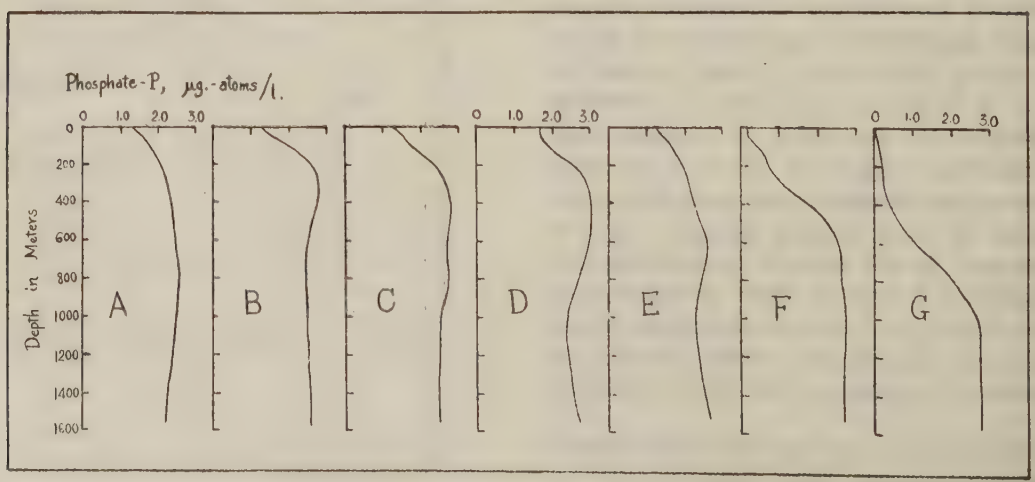
400 m at 40°N. At latitude 40°N and southwards, dissolved oxygen in the surface layer decreases due to the effect of higher water temperature, taking a value below 5 ml per liter in the neibourhood of latitude 30°N. On the other hand, oxygen content below 1 ml in the deep layer disappears in this region, tending somewhat to increase.

The vertical distributions of inorganic phosphate shown in Fig. 3 seem to be just in reversed relation to those of oxygen, namely, the layer of decrease for dissolved oxygen corresponds to the layer of increase for phosphate. However, there is no difference between dissolved oxygen and phosphate so far as the southward slacking of the slope of vertical distributions is concerned.

In case of examining the cause of systematic changes in vertical distributions mentioned above, it may be desirable to distinguish the changes d movements of water masses from those due t logical factor, since dissolved oxygen is one non-conservative properties. In the present sideration, it may be expected that the lateral ing of water masses in the subsurface layers dynamical factor has important effects on the v distributions of chemical properties. For this r the author took σ_t-surfaces as levels, on whic lateral mixing of water masses would take and attempted to draw a distribution of oxyg σ_t-surfaces, showing the pattern in Fig. 4. I figure, exact distances between stations were ig because only a schematic representation as t distribution of oxygen in a section was conside be sufficient to discuss the subject.

It may be recognized in the Fig. 4 that is

Fig. 3. Vertical distribution of phosphate-phosphorus in each station.



Schematic representation of the distribution of ssolved oxygen in a section from St. A to St. G, cing σ_t-surfaces as levels.

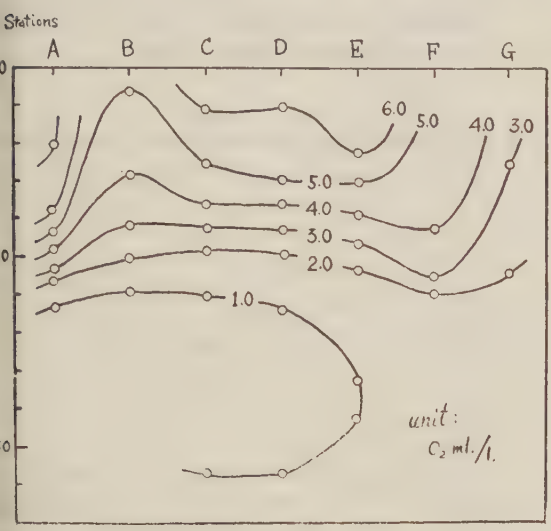
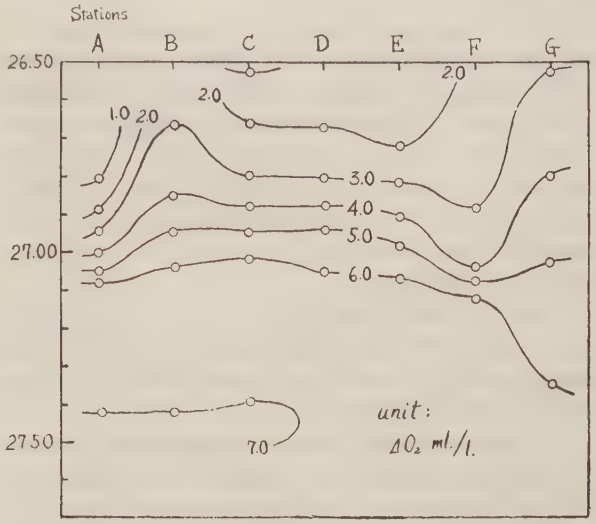


Fig. 5. Schematic representation of the changes of oxygen depletion (ΔO_2) in a section from St. A to St. G, taking σ_t-surfaces as levels.



for oxygen content tend to run in parallel $_t$-surfaces except for some layers such as the layer near the Aleutian Ridge or the whole n the vicinity of the boundary between the nd the warm water masses. This fact may t that the changes in vertical distribution of ed oxygem mentioned above are caused not y the lateral motion of water masses on σ_t-s, but also by the vertical motion. That is, ing or sinking of water masses may probably onsiderable effects on the vertical distribution solved oxygen in the neighbourhood of the an Ridge or so-called Polar Front. Especially, ld be emphasized that the distribution changes tinuously even in the deep layers near the Front.

Fig. 5 was schematically illustrated the changes xygen depletion" in a section, taking σ_t-s as levels. Oxygen depletion has been de-as the difference between the saturation value bserved value of dissolved oxygen and regarded roperty providing a measure how much a water was affected by the biological factor before it bserved. It can be readily seen in the figure he distribution of oxygen depletion is disturbed e effects of vertical movements of water masses ilar as that of dissolved oxygen in the regions he Aleutian Ridge and the Polar Front. It d be remarkable that a water mass having high n depletion spread uniformly in the deep layer e northern region. This water mass may be regarded as a "terminal water mass" affected by the heaviest degree of biological processes.

The author (Fukai, 1954) has reported recently that the linear relationship exists between oxygen depletion and phosphate content in the waters of the Kuroshio Region, and the proportion between oxygen depletion and phosphate coincides with that between liverated oxygen and assimilated phosphate in the case of photosynthesis (Fleming, 1939). On the contrary, there are considerable deviations from the normal proportion in the waters of the northern region.

In order to express the degree of deviation from the normal proportion somewhat quantitatively, it will be convenient to define a quantity of "oxygen depletion anomaly". This quantity will be expressed as follows:

$$\Delta^2O_2=[\Delta O_2]_{\text{theo.}}-[\Delta O_2]_{\text{obs.}}.$$

The left side of this equation denotes the "oxygen depletion anomaly" and the first and the second terms in the right side are theoretical and observed oxygen depletion, respectively. The former in the right side may be computed on the basis of phosphate content, introducing the proportion between liverated oxygen and assimilated phosphate in the case of photosynthesis into the computation. The schematic changes of these anomalies computed for each station are shown in Fig. 6.

In the figure, there exist remarkable domains of considerable deviation in the layers corresponding to

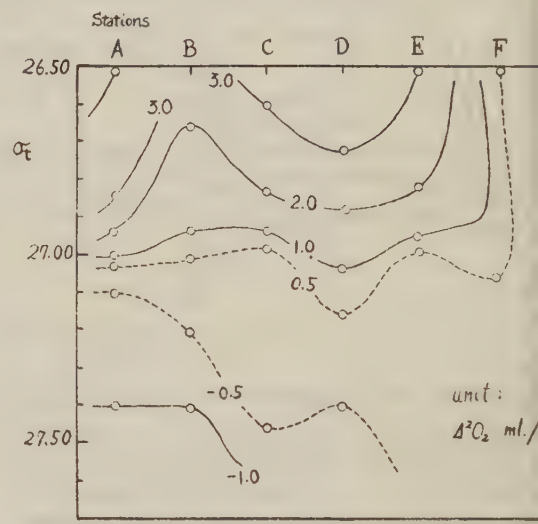
e upper and the deep ones in northern latitudes. ıe domain of deviation in the upper layer includes ıomalies of positive sign, being characterized by e excess of phosphate stock.

This layer may roughly be considered to cor-spond to the convection layer in the regions under ıdy, forming a somewhat independent circulation ithin itself. Thus, the excess of phosphate in the rface layer will not be exhausted by the biological tivity due to the replenishment from the sub-ratum or due to the regeneration from the dead ganisms, so that the layer used to have very oductive character.

On the other hand, the anomalies having nega-ve sign in the deep layer cannot be interpretted early, although these may have a close bearing on e biological processes.

In the above, the author has considered the factors fecting the changes in vertical distributions of ssolved oxygen in the north-western Pacific, al-ough the considerations had to be limited to ther qualitative means. Further quantitative con-sideration evaluating the magnitude of each will be advanced in future.

Fig. 6. Schematic representation of the changes of depletion anomaly (Δ^2O_2) in a section from St St. G, taking σ_t-surfaces as levels.



Summary

In conclusion, the outline of present discussions ll be summarized as follows:

1. Dissolved oxygen in the subsurface layer nds to spread along σ_t-surfaces.

2. Disturbances in vertical distributions of emical properties to be caused by upwelling or nking of water masses take place in the vicinity the Aleutian Ridge or the Polar Front.

3. In the deep layer of northern latitudes distributes a water mass having high oxygen tion. This water mass may be regarded as te one affected by the heaviest degree of bio processes.

4. The upper layer of northern latitude tains the excess of phosphate stock, corresp to the convection layer.

References

ming, R. H., 1939:
"Composition of plankton and units for reporting popu-lations and production", "Proc. the 6th Pacific Science Congress", Vol. 3.

Fukai, R., 1954:
"On the distribution and variation of nutrient the adjacent water to the Aleutian Islands in th Pacific", Bull. Chem. Soc. Japan, 27, 402.

增　　殖

AQOUICULTURE

二枚貝の環境要素としてのビタミン B_{12}—I.

アサリ，ハマグリの棲息環境及び時期による ビタミン B_{12} 含量の差異*

相良順一郎・築瀬正明
（東海区水産研究所）

日本水産学会誌
第二十四巻 第六・七号 別冊
昭和三十三年十一月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, Nos. 6 & 7, Nov. 1958

二枚貝の環境要素としてのビタミン B_{12}—I.

アサリ, ハマグリの棲息環境及び時期による ビタミン B_{12} 含量の差異*

相良順一郎・簗瀬正明
(東海区水産研究所)

Vitamin B_{12} as a Factor in the Environment of Bivalves—I. Seasonal and Environmental Variation of Vitamin B_{12} Content in *Tapes japonica* and *Meretrix meretrix lusoria*

Jun'ichiro Sagara and Masaaki Yanase

It has been reported that the vitamin B_{12} content of bivalves, and of starfish which devour bivalves, is higher than that of fish or other aquatic animals. Recent studies have shown that vitamin B_{12} will affect the growth of *Porphyra tenera* and relate to the development of "red tide". In view of these facts, we made a study of vitamin B_{12} as one of some means to analyze the environment of the shallow water clam bed.

In this experiment we measured the vitamin B_{12} content of *Tapes japonica* and *Meretrix meretrix lusoria*, the bottom substances in which they lived, the fine deposits in the hollow of ripple marks and the plankton which are the food of clams.

Vitamin B_{12} content was determind by *Euglena* method added 1 mg/cc acid hydrolysed casein to Hutner's basal medium, and each sample were digested by trypsin before hot water extraction. Results obtained were as follows:

1. Vitamin B_{12} content in the soft body of *Tapes japonica* and *Meretrix meretrix lusoria* is high before and during spawning, and low after spawning. In *Tapes japonica*, there is a tendency for individuals that live off the coast to be higher in vitamin B_{12} content than those that live near the coast; moreover individuals cultured by the hanging method are higher in vitamin B_{12} content than those raised in the above-mentioned benthic environment. In *Meretrix meretrix lusoria*, however, the above described tendency is not clear. Further, vitamin B_{12} content of *Tapes japonica* is higher than that of *Meretrix meretrix lusoria* during every month of the year (see Tables 1, 2, & Fig. 1).

2. Vitamin B_{12} content of the sandy bottom in the offshore areas is higher than in the shallow coastal beds, and vitamin B_{12} content of same substances divided into three vertical layers is higher in the upper and middle layers and poorer in lower layer. Fine deposits on the hollow of ripple mark are higher in Vitamin B_{12} than in the sandy bottom areas mentioned above. Vitamin B_{12} content in zooplankton (*Copepoda*) is higher than that of phytoplankton (*Coscinodiscus sp.* or *Thalassiothrix sp.*) (see Table 3).

I. 緒　　言

魚類その他の生物に比べて貝類[1),2),3),4),5),6)]及びこれを食害するヒトデ[7)]にビタミン B_{12} が多いことは既にいくつかの報告があり，又アサクサノリの生長を促すといわれ[8)]，赤潮の発生にも関与している[9)]こと等が報ぜられている。これらの事実から従来問題になつている浅海貝類漁場の環境分析の一要素としてビタミ

1958 年 7 月 31 日受理

* 東海区水産研究所業績 B 第 291 号

ン B_{12} を取りあげ本研究を行つた。今回は環境条件，採集時期を異にした場合のアサリ及びハマグリの B_{12} 含量の差異を調べ，又これら貝類の B_{12} 給源として関連の考えられる底質及びプランクトンの B_{12} 含量を測定したので，ここにその結果を報告し，参考に供する次第である。

本文に入るに先だち，終始御指導，御鞭撻を仰ぎ且つ本文の御校閲を戴いた猪野峻博士，本研究の機会を与えられ，又種々御教示と御便宜を戴いた東秀雄博士他ビタミン科員の方々，材料の採集その他に御協力を戴いた加納嘉市，伊藤良信の諸氏に対し，深甚なる謝意を表す。

II. 材料及方法

1. 材料の採集　供試材料はすべて千葉県浦安地先に於いて採集した。採集地点を Fig. 1 に示した。B 地点は沖合で大潮干潮時の水深約 3m の場所であり，C地点は同じ干潮時約 1時間干出するところである。A地点は岸寄りで同じ干潮時約5時間も干出する場所であり，D地点は船の通路になつているので，沖合のB地点同様に全く干出しないところである。E地点に於いては垂下飼育を行つたが，その垂下の方法は網目約 12 mm の綿糸網に貝を入れて海底から約 60 cm 離して吊下し，垂下期間は Table 1 に示した通りである。底質はB地点ではドレッヂにより採集し，C地点では干潮時 15 cm 立方のブリキ製枠を海底にさしこんで上，中及び下層に分けて採集した。A地点では上層の砂を採集した。海底の浮泥はC地点でスプーンを用いて掬い集めたが，多少の砂泥は混入した。プランクトンはネット（網目 95 ミクロン）で海表面の水平曳きを約5分行つて採集した。採集したプランクトンの一部は検鏡を行つて，その主な組成を調べた。

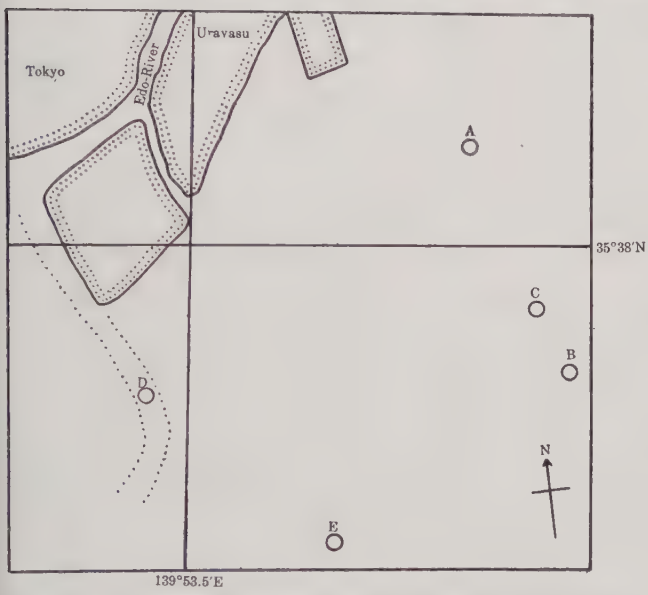


Fig. 1. A map of Urayasu clam bed, showing the stations at which materials were collected.

2. 試料の調製　貝類は各 10 個体をとり，Table 1 に表示した調査を行つた後 B_{12} 抽出に用いた。即ち剝身全部を磨砕し，その中から 2g を秤量してこれに蒸溜水 100 cc と Trypsin 20 mg を加え，Toluene で防腐して 30°C 又は 37°C で 20～24 時間酵素分解せしめた後 15 分間煮沸し，沪液を調製してこれを試料液とした。底質は肉眼的な生物及び貝殻破片等を除いて同じく 2g を秤量し，以後上記貝類の場合と同様にして試料液を調製した。海水と共に採集したプランクトンは定性用東洋沪紙 No. 2 で沪過し，次に沪紙を開き，沪紙上のプランクトンを別の沪紙で軽く圧して水分をとつた後，同様に操作した。試料液は何れも使用するまで冷凍室（0°～5°C）に保存した。

3. B_{12} 定量法　B_{12} の定量は *Euglena* 法によつた。基本培地は酸分解カゼインを添加した HUTNER の中性培地を使用した[10]。培養は 2cc で行い，菌の増殖度の測定は比濁によつた。

III. 実験結果

1. アサリ，ハマグリ体中の B_{12} 含量

A. アサリについては肉量＋殻重量に対する肉重量の比率（以下肉重量比とする）は Table 1 に示す如

Table 1. Seasonal and environmental variations in shell length and condition coefficient* of *Tapes japonica* and *Meretrix meretrix lusoria*.

Station	Date	*Tapes japonica* (10 individuals)			*Meretrix meretrix lusoria* (10 individuals)		
		Shell Length (mm)		Condition* coefficient	Shell Length (mm)		Condition* coefficient
		Range	Average		Range	Average	
A Coast	Aug. 19 1957	31.1–35.0	33.0	36.6 %	—	—	— %
	Nov. 20	35.5–38.8	37.2	29.9	34.0–42.9	37.4	30.4
	Dec. 16	30.5–37.0	33.9	30.1	33.0–38.1	35.4	34.8
	Jan. 20 1958	29.8–37.1	32.3	30.1	32.0–36.3	34.3	33.2
	Feb. 19	37.0–46.6	40.5	28.5	34.6–38.5	37.2	34.7
	April 22	29.2–42.0	35.1	34.3	55.0–56.0	55.5	33.8
	May 21	32.0–37.5	34.8	32.3	29.5–34.1	31.9	32.1
	June 5	32.7–40.0	35.6	32.3	26.0–43.0	31.4	34.6
B Offshore	Aug. 19 1957	28.4–35.0	32.5	38.7	—	—	—
	Aug. 29	32.0–40.5	37.5	32.0	—	—	—
	Oct. 21	—	—	—	40.0–53.5	47.7	37.3
	Nov. 25	31.2–35.7	33.3	31.1	28.0–48.3	36.5	35.2
	Dec. 16	—	—	—	43.5–60.1	52.4	34.4
	Jan. 20 1958	35.0–42.0	38.0	27.9	32.8–48.5	41.8	32.1
	Feb. 19	41.0–50.1	44.8	30.1	—	—	—
	March 10	33.8–48.7	40.3	31.9	37.2–54.0	46.4	34.1
C Offshore	March 10 1958	30.5–52.5	41.3	30.9	27.0–69.8	49.7	33.7
	April 22	34.1–41.0	38.0	35.4	37.0–42.2	38.9	29.3
	May 21	36.7–41.9	39.7	37.8	32.7–46.0	39.4	33.6
	June 5	38.5–42.5	40.8	35.8	36.0–52.5	42.1	39.8
D Water-route	Oct. 21 1957	34.0–39.0	36.9	36.1	38.5–50.0	44.6	36.0
E Hanging	Aug. 19 (7)**	32.6–42.9	37.7	36.2	38.9–60.8	51.8	35.4
	Aug. 29 (16)	35.0–39.2	37.2	38.4	47.8–65.0	54.4	35.5
	Oct. 21 (30)	33.5–39.3	36.5	35.4	38.5–48.7	42.2	36.3
	Nov. 25 (34)	34.8–38.8	37.0	32.1	37.8–44.0	41.2	35.6
	Jan. 20 (34)	34.8–48.0	41.6	26.6	38.7–52.1	45.2	34.6

* $\dfrac{\text{Meat weight}}{\text{Meat weight} + \text{Shell weight}} \times 100$

** No. of days after hanging

く，各地点ともに8月に大で 11 月に急減し，翌年 1，2，月まで漸減し，3月から6月にかけて漸増している。この肉重量比は種々論議があるが[11]，一応アサリの肥満度を表わすもので，別に肉眼的に生殖巣の肥満度を観察（但しアサリ，ハマグリともに8月は観察を欠く）した結果と大体一致していた。これらのアサリの B_{12} 含量を見ると Table 2 の如く8月に多く，11 月に著るしく減じ，2月頃から回復して6月に至つている。B_{12} 含量は略々肥満度に比例し，生殖巣の多い時期即ち産卵前又は産卵期（肥満個体の山は4月～6月初めと9月～10月の年2回）中は B_{12} が多く，生殖巣の少ない時期即ち産卵後は B_{12} が少くなることを示している。

次に各地点についての比較では，同時期に取りあげたものの肉重量比は沖合が沿岸より比較的大きい傾向があるが，B_{12} も沖合が沿岸より多い傾向がある。又垂下飼育したものの肉重量比は1月の分を除いては全

Table 2. Seasonal and environmental variations in vitamin B_{12} content in the soft body of *Tapes japonica* and *Meretrix meretrix lusoria*. (Vitamin B_{12} content in γ per 100 g. fresh matter.)

Species	Station*	Aug. '57	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan. '58	Feb.	March	April	May	June
Tapes japonica	A	7.0	—	—	1.2	1.5	2.5	4.7	—	5.9	5.0	6.3
	B	8.3** 9.0	—	—	2.7	—	2.8	4.2	5.0	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—	5.1	7.4	5.5	9.5
	D	—	—	2.4	—	—	—	—	—	—	—	—
	E	9.3** 11.8	—	5.5	4.5	—	4.2	—	—	—	—	—
Meretrix meretrix lusoria	A	—	—	—	1.2	0.2	0.2	0.2	—	1.2	2.3	4.5
	B	—	—	0.7	0.5	0.4	0.2	—	1.2	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—	0.9	1.9	2.1	5.0
	D	—	—	0.9	—	—	—	—	—	—	—	—
	E	7.0** 7.0	—	0.9	0.7	—	—	—	—	—	—	—

* Same as in Table 1.

** First readings are values obtained on samples collected in the middle of the month, and second readings in the end of the month.

般的にやや大きい値を示しているが，B_{12} 含量も同時期の何れの底棲個体よりも多い。澪（D 地点）のものは 1 回の採集であり，他との比較は出来ないが，B_{12} 含量は垂下飼育のものより少ない。

B．ハマグリの肉重量比の変化は肉眼的に観察した生殖巣の肥満度と必ずしも一致しなかつたが，10月は未だやや肥満した個体もあつたが，11 月以降は次第に体はやせ，12 月から翌年 2 月にかけてこの状態が続き，3 月になつて稍肥り始めるものがあり，6 月には相当肥満した個体が現われた。これらのハマグリの B_{12} 含量は 8 月（垂下）は高い値を示し，10 月に急減し，11 月以降低い値が続き，3 月から増え始め，6 月に高い値を示している。即ちアサリの場合と同様に生殖巣の多い時期，産卵前又は産卵期（6 月初めから 9 月末）[12]中は B_{12} が多く，生殖巣の少ない時期即ち産卵後は B_{12} が少ない。

次に各地点については資料が不足なため充分な比較は出来ないが，測定の範囲では沖合と沿岸，垂下個体と正常底棲個体の間の B_{12} 含量の差は認められない。

又ハマグリの B_{12} 含量をアサリの B_{12} 含量に比較すると，何れの月に於てもハマグリはアサリより少ない B_{12} 含量を示す。

2. 底質並びにプランクトンの B_{12} 含量

アサリ，ハマグリ体中の B_{12} が何に由来するかを知る手がかりとして，これら貝類が棲息する漁場の底質特にその海底表面に存在する浮泥並びにプランクトンについて B_{12} 含量を測定した。この結果を Table 3 に示す。

A．底質　細砂が大部分で泥は極めて少なかつたが，その B_{12} 含量は沖合の B 地点の方が沿岸の A 地点のものより多く，沖合の C 地点で表層，中層（深さ 7～8 cm）及び下層（深さ 15 cm）と 3 層に分けて B_{12} 含量を調べた結果では下層が前二者より少なかつた。

B．海底表面の浮泥　3 月採集のものは干潮時 Ripple Mark の凹部にたまつていた貝の糞の如き細い管状のものであり，4 月採集のものは同じく Ripple Mark の凹部にたまつていた褐色の微小な沈澱物であつたが，B_{12} 含量は概してともに底質のそれより多く，ことに後者の褐色の浮泥は比較的高い値を示した。

C．プランクトン　10月採集のものはその内容が動物プランクトン特に *Copepoda* が殆んどであつて植物プランクトンは極めて少なく，11 月採集のものは *Copepoda* と植物プランクトンの *Thalassiothrix sp.* の両者がほぼ半々を占め，3 月採集のものは植物プランクトンの *Coscinodiscus sp.* が殆んどで，*Copepoda* は極めて少なかつた。これらの B_{12} 含量を測定した結果は動物プランクトンの多いもの程 B_{12} が多く，植物

Table 3. Vitamin B_{12} content in bottom substances and plankton.

Sample	Station		Date	Vitamin B_{12} content (γ/100g.)	Remarks
Bottom substances	A		Jan. 20, 1958	0.05	Sand
	B		Oct. 21, 1957	0.33	
			Jan. 20, 1958	0.15	
			March 10, 1958	0.11	
	C	Upper layer	〃	0.14	
		Middle layer	〃	0.22	
		Lower layer	〃	0.07	
	C		〃	0.38	Fine deposits on the hollow of ripple mark
			April 22, 1958	0.45	
Plankton	B		Oct. 21, 1957	3.50	Mostly zooplankton (*Copepoda*)
			Nov. 25, 1957	0.85	Mostly zooplankton (*Copepoda*) and phytoplankton (*Thalassiothrix sp.*)
			March 10, 1958	0.38	Mostly phytoplankton (*Coscinodiscus sp.*)

プランクトンは動物プランクトンに比し，B_{12} 含量は少ない結果を得た。但し同じ植物プランクトンではあるが，*Skeletonema costatum* の B_{12} 含量は今回の *Copepoda* のそれより高い値を示している[13]。

IV. 考　　察

アサリ，ハマグリ体中の B_{12} 含量は産卵前又産卵期中に多く，7～9γ/100g の高い値を示したが，産卵後に著しく減少した。この現象はヒトデの場合と同様であるが[14]，このことはアサリ，ハマグリが卵を体外に排出したことによるのか，或いは産卵により貝の組織中の B_{12} を消耗したことによるのか不明である。又アサリの垂下飼育したものが底棲個体より B_{12} 含量が多く，沖合に棲むものが沿岸に棲むものより B_{12} 含量が多い傾向を示すのは垂下によりその生殖腺成熟期間が延び生殖巣が肥大していたためか[15]，或いは海水に接触する時間，摂餌機会の多いことに基くものか，今回の実験の範囲では何れとも断定出来ない。

次にアサリ，ハマグリ体中の B_{12} が摂取餌料中の B_{12} に由来するものか，或いはこれら貝自体の消化管内の細菌が生産した B_{12} を吸収したものか不明であるが，アサリ，ハマグリの餌料面から調べると，前述のプランクトンの中 *Copepoda* は比較的大型なミルクイ，オオノガイ等の消化管内には認められているが，アサリ，ハマグリの餌料とはなつていない。しかるに植物プランクトンの *Thalassiothrix sp.* 及び *Coscinodiscus sp.* はアサリ，ハマグリの消化管内に認められている。しかしその量は小量であつて大部分は有機，無機質の砕屑所謂 *Detritus* である[16]。ところで海底面に沈積する浮泥の B_{12} 含量が底質のそれより高く，植物プランクトンと並ぶ B_{12} 含量を有することは B_{12} 含量の見地から，この浮泥がアサリ，ハマグリの餌料の構成成分となる可能性を示唆していると思われる。しかし垂下飼育の場合には一応海底面とは隔絶しているので，餌料は海水中から摂るとしか考えられない。しかるに比較的沖合の海水の結果ではあるが，海水自体の B_{12} 含量は数 $m\gamma/l$ 程度の場合が多いので[17),18)]，垂下飼育のものに B_{12} が多いのは海水自体が主であるとは思われず，海水中に懸濁する物質に由来しているのではないかと推測される。今後はこれ等の機構を究明すべく，生殖巣はじめ，各器官に於ける B_{12} 含量の季節的消長，産卵等による貝の組織中の B_{12} 含量の消長等について研究を進める考えである。

V. 摘　　要

千葉県浦安地先に於けるアサリ，ハマグリの棲息環境及び時期による体中のビタミン B_{12} 含量の差異等を

調査して次の結果を得た。

1. アサリ，ハマグリともに生殖巣の多い時期即ち産卵前又は産卵期中に体中に B_{12} 含量が多く，生殖巣の少ない時期即ち産卵後は B_{12} 含量が少ない。

2. 天然に沖合に棲息するアサリは沿岸に棲息するものより B_{12} 含量が多い傾向があり，人為的に垂下飼育したものは底棲のものより更に B_{12} 含量が多い。ハマグリについては資料不足のため上記の如き傾向は明らかでなかつた。

又ハマグリの B_{12} 含量は何れの月に於てもアサリのそれより少なかつた。

3. 底質は沖合のものが，沿岸のものより B_{12} 含量が多い傾向があり，沖の底質を垂直的に3層に分けて調べた B_{12} 含量は表層と中層に多く，下層が少なかつた。又浮泥は底質より B_{12} 含量が多い。プランクトンは動物プランクトンを多く含むもの程 B_{12} 含量が多く，植物プランクトンは動物プランクトンより B_{12} 含量が少なかつた。

4. 上記の結果に基づいてアサリ，ハマグリ体中の B_{12} 源と考えられる餌料についての考察を行つた。

文　　献

1) Proctor, B. E., Lang, D. A.: Nature, **168**, 36～7, (1951).
2) Maxwell, B. E.: J. Fish. Res. Bd. Can., **9**, 164～168, (1952).
3) 簗瀬: 本誌, **18**, 24～26, (1953).
4) 橋本・山田・森: 本誌, **19**, 135～140, (1953).
5) 佐藤: ビタミン, **6**, 212, (1953).
6) Teeri, A. E., Loughlin, M. E., Jossely, N. D.: Food Research, **22**, 145～150, (1957).
7) 簗瀬: 本誌, **19**, 1200～1202, (1954).
8) 柏田: 昭和 32 年度日本水産学会年会講演.
9) 雑誌 "Time", April, 9, (1956).
10) 佐藤: ビタミン, **6**, 200, (1953).
11) 古川・久岡: 内水研報告, **10**, 1～19, (1957).
12) 滝: 本誌, **15**, 479～486, (1950).
13) 橋本・佐藤: 本誌, **19**, 987～990, (1954).
14) 簗瀬: 本誌, **21**, 194～196, (1955).
15) 高: 本誌, **23**, 394～399, (1957).
16) 平坂: 浅海利用調査報告 (第1報), 1～99, (1917).
17) 柏田・柿本・盛田・金沢・川越: 本誌, **22**, 637～640, (1957).
18) 柏田・柿本・川越: 本誌, **23**, 450～453, (1957).

漁　具　漁　法

FISHING GEAR AND METHODS

魚群探知機の記録から魚群の游泳速度を測定する一つの試み (予報)

川田三郎・田原陽三・吉牟田長生
(東海区水産研究所)

An Attempt for Determining the Swimming Speed of Fish Schools by the Fish Finder (Preliminary Report)

Saburo KAWADA, Yozo TAWARA, and Chosei YOSHIMUTA

The swimming speed of fish schools passing through the entrance of a set net has been calculated on the basis the recorded figures on a linear system fish finder. The methods used for the calculation are as follows.

When the transmitting and receiving oscillators are fixed slantingly downwards to the entrance of a set net (Fig. 1), the recorded figure of fish schools passing through the entrance of the net may be estimated in a line as indicated figure 2. If we set the angle of inclination of recorded figure "ab" towards the axis of time "T" is represented by "α", the approximate swimming speed "S" of fish schools will be formulated as

$$S \fallingdotseq (v/h) \tan \alpha \sec \gamma$$

where S: swimming speed of fish schools,
v: conveying velocity of recording paper,
h: reduced scale of recorded figures,
α: the angle of inclination of recorded figure toward the axis "T",
γ: the angle of inclination formed by the projecting direction of ultrasonic-wave and water surface.

As the result of field test which was carried out at night applying the above method to a set net commercially operated for horse-mackerel. The swimming speed of the fish schools horizontally swimming in and out of the net has been estimated to range from 0.05 to 0.55 m/sec (Table 1 and Fig. 5).

緒言: 魚群探知機を用いて魚群の游泳速度を測定することは魚群探知機の性能や魚群の游泳状態の差異等のため正確を期することは容易ではない。しかし現用の魚群探知機でも或る条件下の魚群の游泳速度ならば比較的正確に且つ簡単に魚群像から測定が可能である。ここには定置網の羽口を通過する魚群の游泳速度を測定したのでその結果を報告する。

測定の方法: 今 Fig. 1 に示すように定置網の羽口に固定された送波器から超音波が羽口の前方斜下向きに投射され魚群は羽口の前方または後方に向つて水平に一定速度で移動する場合を考える。

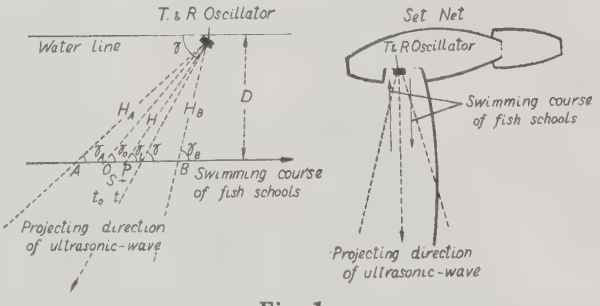


Fig. 1.

(1) 直線式魚群探知機について:

1958 年 1 月 11 日受理 東海区水産研究所業績 B 第 238 号

Fig. 1 に示すように水面と超音波投射方向とのなす角を γ とし魚群が超音波束を通過するときの記録が出始める点 A と，消える点 B との送受波器からの距離をそれぞれ H_A m, H_B m とする。

魚群が超音波束を D m の水深で水平に S m/sec で通過するとき任意の点 O に於ける超音波投射角を γ_0 とし t 秒後の点 P に於ける投射角を γ_t とし，そのときの送受波器からの距離を H m とすれば (Fig 1 参照)。

$$H^2 = D^2 + (D\cot\gamma_0 - St)^2$$

これを t で微分すれば

$$\frac{dH}{dt} = -S\frac{(D\cot\gamma_0 - St)}{H}$$

$$= -S\frac{\sqrt{H^2 - D^2}}{H}$$

$$= -S\sqrt{1-\left(\frac{D}{H}\right)^2}$$

$$= -S\cos\gamma_t$$

従つて

$$S = -\frac{dH}{dt}\sec\gamma_t$$

γ_t は A では γ_A で B では γ_B であるから

$$\gamma_A < \gamma_t < \gamma_B$$

で $\left|\frac{dH}{dt}\right|$ は A から B にゆくに従つて漸減し，記録は Fig. 2 のように曲がり $\widehat{ab}$ となる。

$\widehat{ab}$ の時間の軸 T に対する傾きを α ($\angle cab$) とすると魚群探知機の紙送り速度が v mm/sec, 記録紙の寸法が h mm/m に縮尺されていると

$$\tan\alpha = \frac{h(H_A - H_B)}{v(t_B - t_A)}$$

だから

$$\left|\frac{dH}{dt}\right|_a > \frac{v}{h}\tan\alpha > \left|\frac{dH}{dt}\right|_b$$

従つて S の近似計算には

$$S \fallingdotseq \frac{v}{h}\tan\alpha\sec\gamma$$

を用いる。

(2) 円弧式魚群探知機について: 前述のようにして記録をとつた場合円弧式では Fig. 3 のように記録

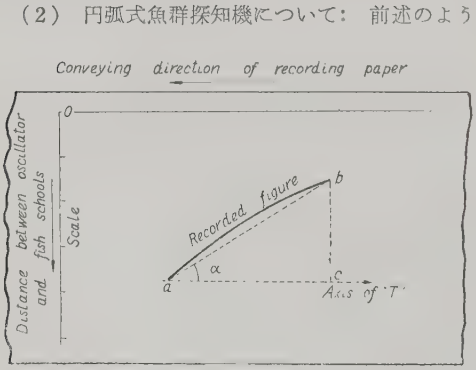


Fig. 2. Estimated line of fish schools to be recorded on the linear system finder when entering in the net.

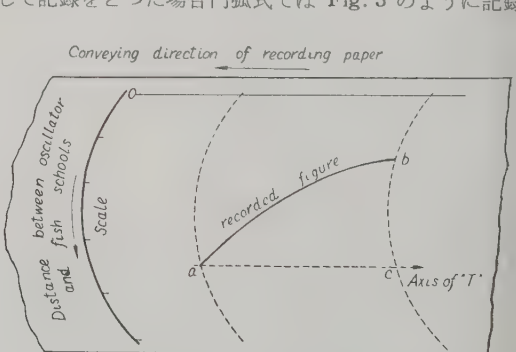


Fig. 3. Estimated line of fish schools to be recorded on the rotary system finder when entering in the net.

される。

$$\overline{ac} = v(t_B - t_A)$$
$$\widehat{cb} = h(H_A - H_B)$$

だから

$$\frac{H_A - H_B}{t_B - t_A} = \frac{v}{h} \cdot \frac{\widehat{cb}}{\overline{ac}}$$

従つて円弧式では S の近似計算には

$$S \fallingdotseq \frac{v}{h} \cdot \frac{\widehat{cb}}{ac} \sec \gamma$$

を用いる。

測定の結果: 1953 年 11 月 6, 7 日相模湾岩漁場に於いて定置網の羽口 (33 k) を通過するアジ小魚群について日本無線 K. K. の NMD-210 型魚群探知機 (50 KC, 直線式, 乾式) 送受波器を定置網の羽口中央に $\gamma = 30°$, 水深 1 m に保つて測定した結果は Table 1 に示す通りで入網魚群及び出網魚群別に級間隔を 0.05 m/sec としてそれぞれの記録の頻度をとると Fig. 5 のようになつた。

定置網の羽口を通過する魚群の游泳速度は Fig. 5 に示された如くで入網魚群では 0.10～0.55 m/sec の範囲で平均游泳速度は 0.271 m/sec, 出網魚群では 0.05～0.35 m/sec の範囲で平均游泳速度は 0.203 m/sec

Table 1. Obtained values by calculation in experiment.

Time	α	S m/sec	Time	α	S m/sec	Time	α	S m/sec	Time	α	S m/sec
h m			h m			h m			h m		
18.10	−41°	−.27		43°	.29		37°	.24		−40°	−.26
	49°	.36		50°	.37		40°	.26		−37°	−.24
	35°	.22	19.50	35°	.22		−37°	−.24		−45°	−.31
	44°	.30		45°	.31	21.20	40°	.26		−41°	−.26
	42°	.23		−25°	−.15		39°	.26		−31°	−.19
	−27°	−.16		50°	.37		33°	.21		−35°	−.22
18.20	30°	.19	20.00	60°	.54	21.30	30°	.20	23.00	—	—
	29°	.18		45°	.31		37°	.24	23.10	—	—
18.30	36°	.23		44°	.30	21.40	40°	.26	23.20	—	—
	29°	.18		45°	.31		36°	.23	23.30	−33°	−.21
	48°	.34		35°	.22		38°	.25	23.40	30°	.19
	41°	.27	20.10	50°	.37	21.50	43°	.29		−24°	−.14
	32°	.20		48°	.34		45°	.31		−30°	−.19
18.40	50°	.37		30°	.19		40°	.26	23.50	—	—
	−30°	−.19		48°	.34		38°	.25	00.00	23°	.13
	40°	.26	20.20	46°	.32		47°	.33	00.10	—	—
	−23°	−.13		49°	.36	22.00	25°	.15	00.20	—	—
18.50	46°	.32		38°	.23		37°	.48	00.30	—	—
	41°	.27	20.30	—	—		40°	.26	00.40	—	—
	42°	.28	20.40	25°	.15		−25°	−.15	00.50	—	—
	40°	.26		−15°	−.09		−29°	−.18	01.00	—	—
	42°	.28		−15°	−.09	22.10	−30°	−.19	01.10	42°	.28
	34°	.21	20.50	—	—		−37°	−.24	01.20	—	—
19.00	50°	.37	21.00	−45°	−.31	22.20	−29°	−.18	01.30	45°	.31
19.10	—	—		45°	.31		−26°	−.16	01.40		—
19.20	38°	.25		40°	.26	22.30	−45°	−.31	01.50	—	—
19.30	40°	.26		42°	.28		−34°	−.21	02.00	—	—
	50°	.37		35°	.22		−48°	−.34	02.10	−25°	−.15
	43°	.29		−30°	−.19	22.40	−40°	−.26		−25°	−.15
	53°	.41	21.10	−20°	−.12		−30°	−.19			
	51°	.38		−20°	−.12		−40°	−.26			
19.40	−37°	−.24		43°	.29	22.50	−37°	−.24			

Note: Negative numerals show the values based on the figure of fish leaving the set net.

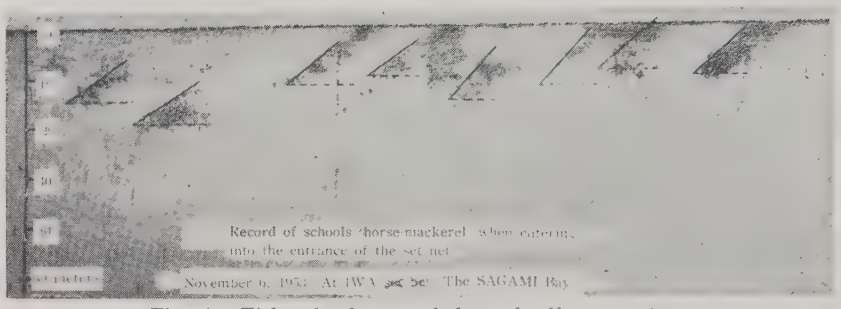


Fig. 4. Fish schools recorded on the linear system finder when entering in the net.

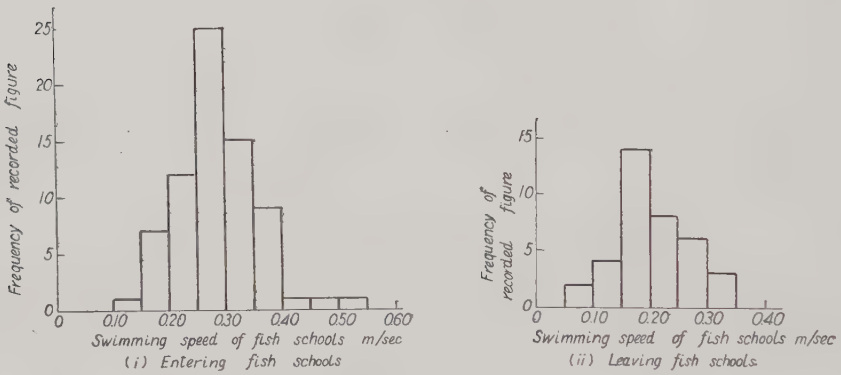


Fig. 5. Frequency distribution of swimming speed of fish schools.

を得た。以上の結果は前述の如く魚群が羽口を前方より後方へ又後方より前方へ水平に游泳したものと仮定して得た結果である。尚今後魚群の行動及び魚群がこれらの仮定を満足しなかつた場合の測定方法についても研究する心算である。

本稿を終るに当り有益なる御助言と御校閲を賜わつた東京水産大学名誉教授田内森三郎博士，東海区水産研究所源生一太郎所長，高山重嶺技官及び栗田晋技官に深謝の意を表わす。またこの実験と資料取纏に協力された本研究所漁具漁法部員に対して感謝の意を表わす。

尚本研究費の一部は農林省応用研究費に依つた。

魚群探知機による定置網漁場における魚道の測量の一つの試み (予報)

川田三郎・田原陽三
(東海区水産研究所)

An Attempt for Detecting the Swimming Course of Fish Schools at a Set Net Fishing Ground by Fish Finder (Preliminary Report)

Saburo Kawada and Yozo Tawara

It is important for improving the catching efficiency of set net to detect the swimming course of fish schools in fishing areas. For this purpose the experiments were carried out at Yoshihama Bay, Iwate Prefecture during November to December, 1954 (Table 1).

Two survey boats, each installed with a vertical type of fish finder, sailed back and forth along the detecting course selected as shown in Fig. 1. A number of points where we encountered with fish schools, were plotted on a chart to calculate the encounter index. The swimming course of fish schools was estimated as follows.

The fish schools which enterd the northern part of the bay, at a speed of 0.5～2 m/sec (Tables 3 and 4), swam to the south along the isobath of 40～60 meters and reached at the front of the set net. According to our observation they were expected to fall into the set net on their way of going out the bay (Figs. 3 and 4).

Further studies are under way to obtain better results by using simultaneously a vertical type and a horizontal type of fish finder.

緒言: 定置網の漁獲性能を向上させるためには種々の要件が考えられるが，魚群が湾内に差込んでからどのように移動し定置網に入るかを知ることは重要な要件の一つであろう。すなわち魚道を知るということは魚群の入網を待つという消極的な定置網漁業にとつては網の設定位置の決定上重要な問題である。そこで吾々は魚群探知機を利用して湾内の魚道の測量を試みた。取敢えず資料の整理について残された疑点の検討は別の機会に譲つて，本文では測量の方法とその結果を報告する。

測量の方法: 測量を試みた海域は吉浜湾(岩手県)であつて，この湾に於ける魚群の動きの全般的な姿を把握することを主目的に，特に網の前面に重点を置いて測量線をなるべく等深線に直交させ，なお，また航走時に明瞭な目標を与えるように，逆K字型と三角型の二つの測定線を撰んだ (Fig. 1)。測量線上を 4～5 節で往復する魚群探知機の記録から遭遇した魚群位置をチャート上にプロットした上で魚群遭遇指数を計算して魚道を推定した。

1. 魚群遭遇指数の求め方: 各測量線を 200 m 毎に区切り全区間を通じて平均の遭遇魚群数を求め，i 回目の測量にこれが X_i で A 区間で A_i, B 区間で B_i, C 区間で C_i $\cdots\cdots$ であるとき

$$\sum (A_i - aX_i)^2$$

を最小とする値すなわち

$$a = \frac{\sum A_i X_i}{\sum X_i^2}$$

1958 年 7 月 31 日受理
東海区水産研究所業績B第 293 号

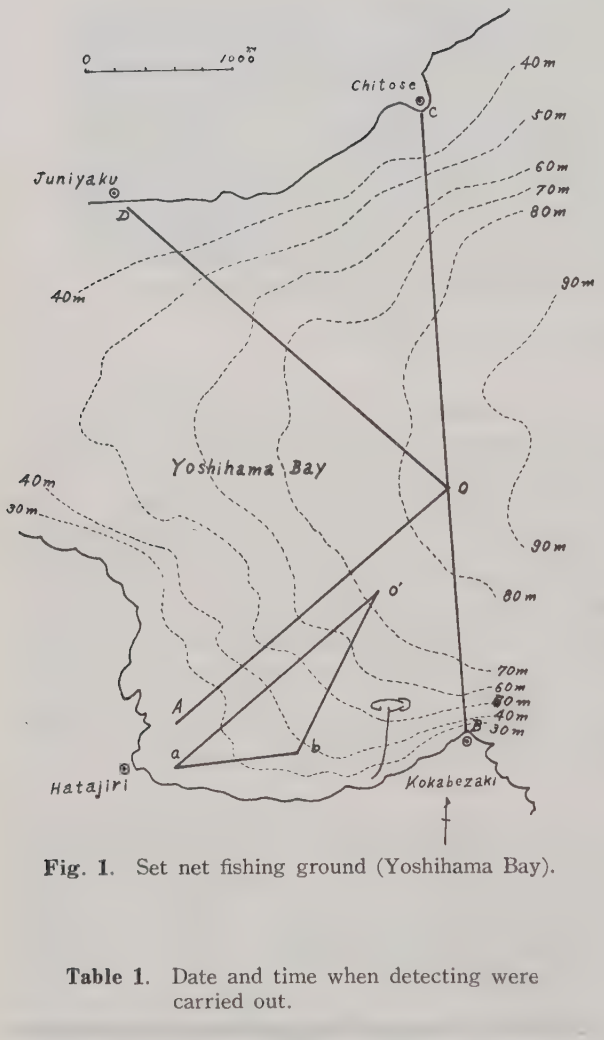


Fig. 1. Set net fishing ground (Yoshihama Bay).

Table 1. Date and time when detecting were carried out.

Inverted K course			Triangle course		
No.	Date	Time	No.	Date	Time
1	Nov. 6	$14.^{10}$～$16.^{32}$	I	Nov.13	$10.^{28}$～$12.^{08}$
2	〃 7	$05.^{09}$～$07.^{50}$	II	〃 16	$11.^{17}$～$12.^{24}$
3	〃 7	$13.^{25}$～$15.^{53}$	III	〃 16	$15.^{04}$～$16.^{12}$
4	〃 8	$05.^{35}$～$08.^{05}$	IV	〃 17	$11.^{15}$～$14.^{16}$
5	〃 8	$13.^{04}$～$15.^{45}$	V	〃 19	$10.^{20}$～$11.^{18}$
6	〃 9	$04.^{54}$～$07.^{52}$	VI	〃 24	$09.^{27}$～$12.^{17}$
7	〃 9	$14.^{41}$～$16.^{44}$	VII	〃 25	$12.^{45}$～$14.^{07}$
8	Dec. 1	$13.^{22}$～$15.^{07}$	VIII	〃 28	$10.^{02}$～$12.^{14}$
9	〃 2	$05.^{53}$～$07.^{36}$			
10	〃 2	$13.^{04}$～$14.^{53}$			

でもつて A 区間の魚群遭遇指数とする。

魚群探知機の記録像から魚種の判定，魚群量の決定等は困難であるのでここでは単に遭遇魚群数のみを用いることにした。

2. 移動速度の求め方： 記録像からは直ちに同一魚群と断定は出来ないが，記録像の形状その他から同一魚群と認定される記録像をピックアップして遭遇位置と時間の関係から湾内に於ける移動速度を推定した。

3. 游泳水深の求め方： 魚群の游泳水深としては記録像の上限の水深を用いた。

なお，移動の方向を確認するために追尾をも行つた。

測量の結果： 1954 年 11 月初旬から 12 月初旬にかけて，逆 K 字型測量線には岩手県水産試験場の早池峰丸で地崎製作所 K.K. の CK-252 型魚群探知機（40 KC, 円弧式，湿式）を使用し，三角型測量線には釣漁船をチャーターし，日本無線 K.K. の NMD-203 型魚群探知機（50 KC, 円弧式，乾式）を使用した（Fig. 1 及び Table 1）。

o または o′ を基点とする測量線の各々について魚群遭遇指数を計算した結果は Fig. 2 及び Fig. 3 の通りでこの計算を Table 2 に例示する。

移動速度の推定は Table 3 及び Table 4 に示す通り。

游泳水深すなわち魚群の上面の水深は Fig. 4 及び Fig. 5 に示す。

以上の結果から魚道を推定することは測量回数の少いこと，資料の解折の不確かさのため困難であるが，魚群探知機による魚群の追尾，魚群の直接観察，海鳥の観察等と考え合せて次のようにいうことが出来る。

1. 湾内全体の動き： 湾内に差込んだ魚群は 1～2 m/sec. の速さで陸に接近して水深 40～60m 線の範囲を等深線に平

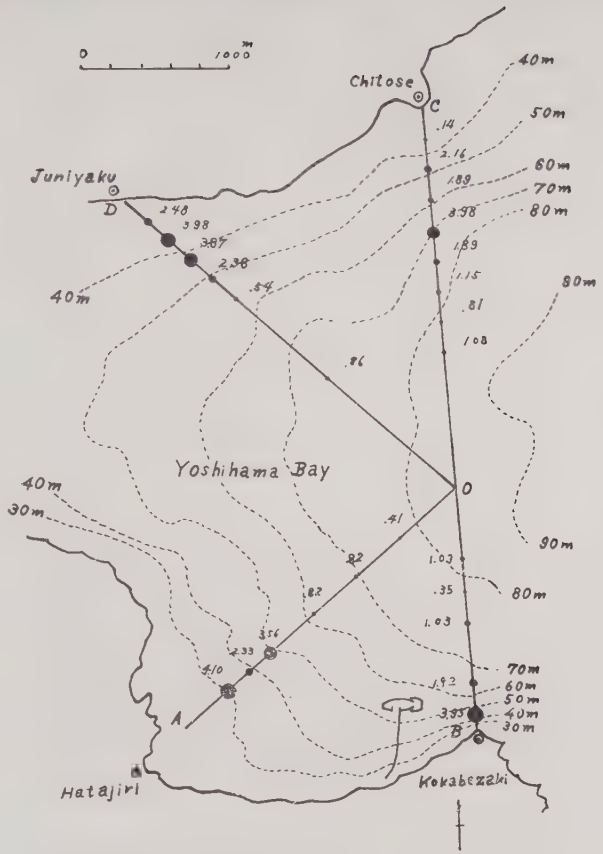


Fig. 2. Encounter index of fish schools in the inverted K course.

Both size of the dots and numerals along them the encounter index.

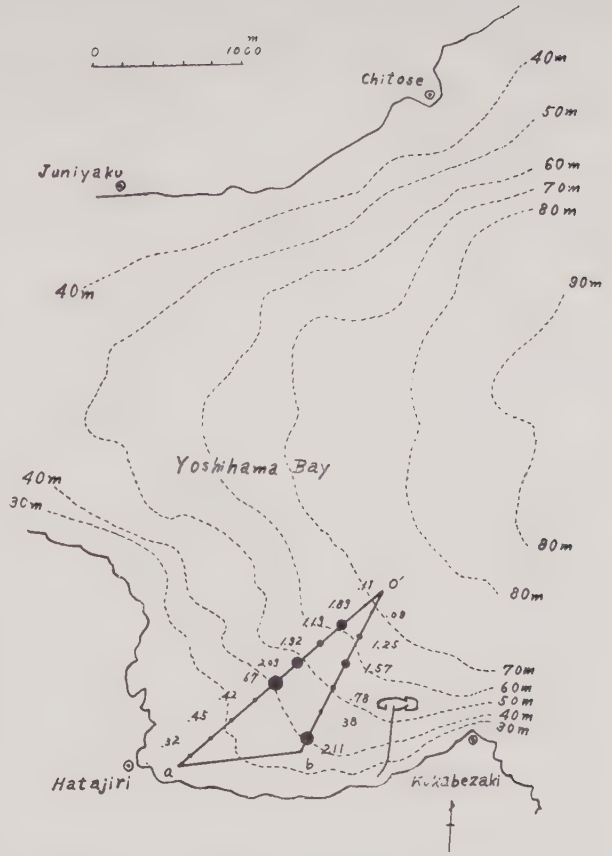


Fig. 3. Encounter index of fishchools in the triangle course.

Both size of the dots and numerals along them the encounter index.

Table 2. Encounter index calculated from

Distance from A to O	0		200		400		600		800		1000	
i	A_i	A_iX_i	B_i	B_iX_i	C_i	C_iX_i	D_i	D_iX_i	E_i	E_iX_i	F_i	F_iX_i
1					.50	.042	.50	.042				
2					.50	.021						
3			1.00	.083								
4												
5			.50	.063	.50	.063	.50	.063				
6												
7			1.00	.250			1.00	.250			.50	.125
8			.50	.063			.50	.062				
9			1.00	.167	1.00	.169						
10					.50	.063	1.00	.125				
Σ				.626		.350		.543				.125
$a=\frac{\Sigma N_iX_i}{\Sigma X_i^2}$			4.10		2.33		3.56				.82	

Table 3. Swimming speed of fish schools in the inverted K course.

Date	Encountering course	Distance	Time	Swimming speed
		m	min.	m/sec.
Nov. 8	OD～OA	4,000	74	.9
〃 9	OC～OD	1,600	18	1.5
Dec. 1	OC～OA	5,600	55	1.7
〃 2	OA～OB	1,800	25	1.4
〃 2	OC～OD	1,600	26	1.0
〃 2	OC～OA	5,600	27	1.6

Table 4. Swimming speed of fish schools in the triangle course.

Date	Encountering course	Distance	Time	Swimming speed
		m	min.	m/sec.
Nov. 16	o′a～o′b	350	7	.8
〃 16	〃	300	6	.8
〃 16	〃	350	8	.7
〃 16	〃	500	12	.7
〃 16	o′a～ab	400	16	.4
〃 17	o′a～o′b	500	12	.7
〃 24	〃	100	1	1.7
〃 24	〃	250	6	.7
〃 25	〃	150	2	1.2
〃 28	〃	150	7	.3
〃 28	〃	400	13	.5

行して湾奥部に到り，南側に転じて小壁漁場前面の窪みに落付き，小壁漁場前面を離れて湾外に去ろうとする際小壁の網に出合うものと推定される。その時の游泳水深は 15～30m のものが多い。

2. 網前面の動き： 小壁漁場前面の窪みに落付いた魚群の一部は .5～1 m/sec. の速さで垣網前面に向い，また一部は沖合に転じて 1～2 m/sec. の速さで湾外に向うものと推定される。游泳水深は o′～a コースでは 5～30 m，o′～b コースではそれよりやや広く 5～40 m に多い。湾外に去ろうとする際網を認識すると魚群は幾らか深く潜るのではないかと思われる。

今回の測量には鉛直式魚群探知機のみを使用したが水平式魚群探知機の発達にともない両者を併用すればさらに魚道の測量は次のような点で確実さを増すものと思われる。魚群遭遇指数は遭遇魚群数から計算したもので魚群の移動方向，魚群の量等を考慮に入れてないが水平式魚群探知機の併用によつてそれらの点が或程度まではつきりする。

the data in the course extending from A to O.

00	1400	1600	1800	2000	2200	2300 m							
G_i	G_iX_i	H_i	H_iX_i	I_i	I_iX_i	J_i	J_iX_i	K_i	K_iX_i	L_i	L_iX_i	X_i	X_i^2
												.083	.0069
												.042	.0018
												.083	.0069
												.000	.0000
												.125	.0156
												.000	.0000
		.50	.125									.250	.0625
						.50	.063					.125	.0156
												.167	.0279
												.125	.0156
			.125				.063						.1528
		.82				.41							

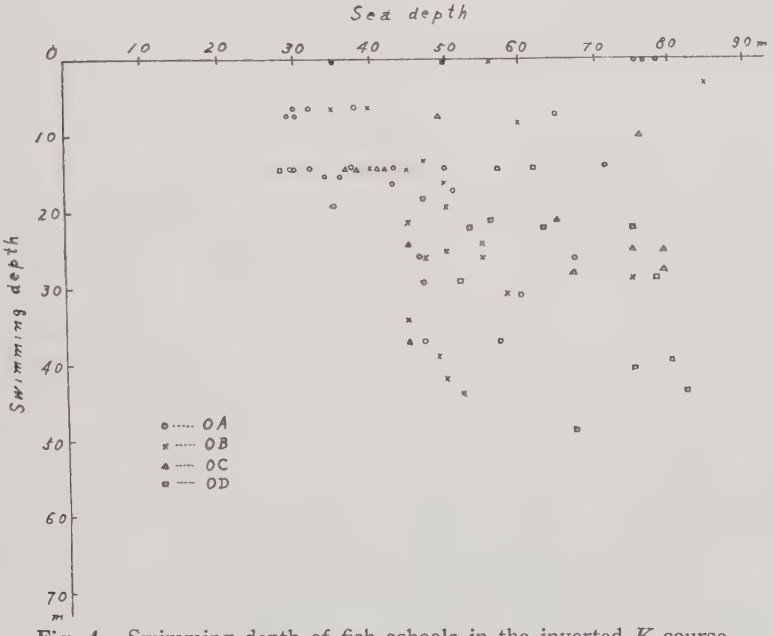


Fig. 4. Swimming depth of fish schools in the inverted *K* course.

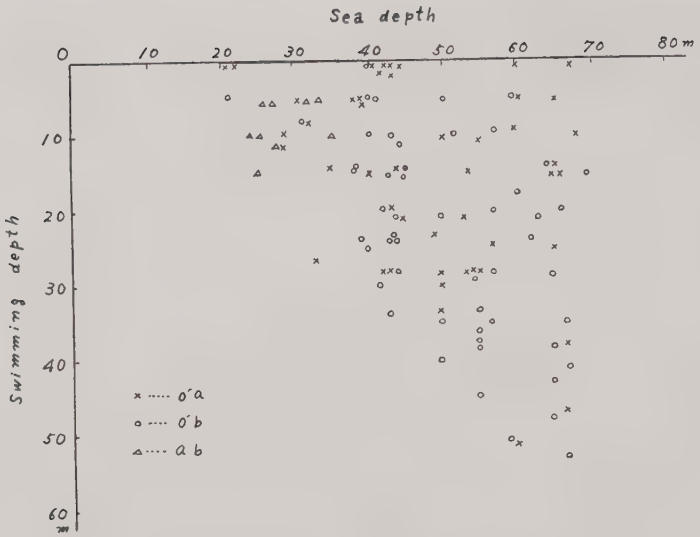


Fig. 5. Swimming depth of fish schools in the triangle course.

本稿を終るに当り有益なる御助言と御校閲を賜わつた東京水産大学名誉教授田内森三郎博士，東海区水産研究所高山重嶺技官に深謝の意を表わす。この実験と資料取纏に協力された，本研究所漁具漁法部員，またこの実験に協力された岩手県水産試験場の方々および小壁漁場の方々に感謝の意を表わす。

なお，本研究に農林省応用研究費の補助をえたことを附言する。

参考までに小壁網の実験中の日日の漁獲量を Appendix table 1 に示しておく。

Appendix table 1.

Daily catch in Kokabe set net during the experiment. (1 kan ≒ 3.75 kg)

Date	Yellowtails	Mackerels	Others	Total	Date	Yellowtails	Mackerels	Others	Total
	kan	kan	kan	kan		kan	kan	kan	kan
11.6	—	779.5	—	779.5	11.20	609.1	614.3	12.4	1235.8
7	185.8	699.8	143.7	1029.3	21	93.8	107.6	37.8	239.2
8	640.8	—	397.8	1038.6	22	—	—	—	—
9	18.2	544.3	100.3	662.8	23	882.3	1675.1	98.0	2655.4
10	12.0	1.2	125.1	138.3	24	607.7	660.0	24.6	1292.3
11	100.6	—	716.0	816.6	25	167.7	121.3	—	289.0
12	100.5	2000.8	6.7	2108.0	26	11.5	2261.0	134.5	2407.0
13	5820.1	2697.3	92.1	8609.5	27	447.6	1460.0	13.4	1971.0
14	971.9	3352.8	250.5	4575.2	28	995.5	—	9.5	1005.0
15	—	1142.3	60.7	1203.0	29	582.8	51.4	7.3	641.5
16	1156.4	780.2	93.8	2030.4	30	8435.0	530.0	2.7	8967.7
17	12.5	698.8	141.3	852.6	12.1	15159.8	516.0	74.0	15749.8
18	358.5	54.6	27.7	440.8	2	7823.4	7.6	354.5	8185.5
19	8.0	30.0	38.4	76.4	3	10045.6	—	55.0	10100.6

海水中に浸漬された網糸の強さの変化について　II.

コールタール染合成繊維網糸の強伸度と温度との関係及び海水浸漬による強さの変化

下崎吉矩・野沢　靖*

(東海区水産研究所)

日本水産学会誌

第二十四巻第四号　別刷

昭和三十三年八月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of

the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 24, No. 4, August 1958

海水中に浸漬された網糸の強さの変化について—II.
コールタール染合成繊維網糸の強伸度と温度との関係及び海水浸漬による強さの変化

下崎吉矩・野沢　靖*
(海区水産研究所)

On the Change in Strength of Netting Cords Immersed in ihe Sea—II.
Relation between the Strength of Tarred Shnthetic Cords and the Temperature, and Comparison of Power of These Cords Changing When Immersed in the Sea

Yoshinori Shimozaki and Yasushi Nozawa

In the previous paper reporting changes the strength of cords immersed in the sea, the description was mainly concerned with non-treated synthetic cords. Whereas, the present work deals with tarred synthetic cords subjected to the sea immersion to see relationship between the tensile strength and the testing temperature as well as change in the strength that likely occurs during the immersion. The tarred synthetic cords used include Amilan, Cremona, Kanevyan and Saran. Each of them was categorized, as before, into B_1 and B_2: the former group being immersed continuously, while the latter intermittently.

1) Among the results obtained Figs. 1 and 2 show relationships between the experimental period and either the tensile strength or elongation along with mean testing temperatures which varied depending on a testing day.

2) In laboratory experiments of the same materials as used for the sea immersion it has been confirmed that tensile strength of the cords may be indicated with function of quadric or a higher degree in relation to the testing temperature. Relationship between tensile strength with temperature $S_{0\theta}$ or between elongation with temperature $E_{0\theta}$ may be expreseed by an experimental formula, respectively:

$$S_{0\theta} = a + b\theta + c\theta^2 \qquad 3 \leqq \theta \leqq 30$$
$$E_{0\theta} = a' + b'\theta + c'\theta^2 \qquad 3 \leqq \theta \leqq 30$$

From the experiments the constant, such as a, b, c, a', b' and c', were obtained as shown in Table 1.

3) When $S_{i\theta}$ represents the tensile strength at θ°C of a tarred cord which has been submerged in the sea continuously or intermittently during i days, change of the tensile strength K_i is measured as

$$K_i = \frac{S_{i\theta}}{S_{0\theta}}$$

In the same way, change in the elongation K'_i is

$$K'_i = \frac{E_{i\theta}}{E_{0\theta}}$$

4) Let K_i^j represent the mean ratio of changes from the tensile strength as of the i-th day to that on the j-th day after inception of the immersion, then

$$k_i^j = \{(K_i - K_j)/(j-i)\} \times 100 \quad (\%)$$

The mean ratio as to the elongation, k'^j_i is in the same way

1958 年 5 月 14 日受理　東海区水産研究所業績 B 第 284 号
* 野沢靖　現在三重県立大学水産学部

$$k'^{j}_{i} = \{(K'_i - K'_j)/(j-i)\} \times 100 \quad (\%)$$

The ratios K and K' are obtained theoretically by

$$\frac{dK}{di} = f_{(i)} \quad \& \quad \frac{dK'}{di} = \varphi_{(i)}$$

$$K = K_0 + \int_0^i f_{(i)}\, di \quad \& \quad K' = K'_0 + \int_0^i \varphi_{(i)}\, di$$

where $f(i)$ is a general form of k and $\varphi_{(i)}$ of k'.

5) So far the experiments have revealed that tensile strength of tarred synthetic cords in general tends to be more affected in summer, than any othor season while the strength of a particular synthetic cord, Cremona, is decreased during summer to fall: however, the change in the elongation of these cords seems uniform throughout the submerging perind.

前報[1]においては漁網用に最も広く用いられている3種の天然繊維，綿，マニラ麻，ラミーのカッチ染網糸及び4種の合成繊維，アミラン，クレモナ，カネビヤン，サランの無染漁網糸の海水浸漬中の強伸度の変化について述べ，これらの網糸の抗張力は冬期に増大し夏期に減少する曲線を以つて変化するが，これは網糸自体の強伸度の変化とは別に，網糸に張力が加わるときの温度の高低に左右されるためであることを実証し，実際にはこれらの網糸の強伸度は海水浸漬時間と共にほぼ直線的に減少していくことを指摘した。

著者等はここに，この試験において同時に実施されたコールタール染各種網糸の強伸度の変化とこれに関連あるタール染網糸の強伸度と温度との関係について報告する。各種網糸の中，綿糸，マニラ麻トワイン，ラミー網糸の強伸度変化については次報にゆずる。

I　海水浸漬試験

1. 供糸試及び試験方法

供試糸及びその染着方法，網糸の浸漬方法及び場所，試験機，海水の温度及び網糸の海水浸漬と風日乾回数等は前報に同じ。試験期間は 1952 年 8 月 29 日より 1954 年 9 月 3 日までの 730 日で前報のものより 260 日延長された。この期間の平均水温及び風日乾繰返しの数は附表1に示した。この期間の B_2 群網糸の海水中にあつた日数は 122 日，空中にあつた日数は 138 日であつた。B_1 群網糸とはこの実験において海水中に連続的に浸漬された網糸のグループをいい，B_2 群網糸とは2日おきに海水浸漬と風乾とを繰返した網糸のグループという。コールタールの酸価は 13.3 であつた*。

2. 結　　果

コールタール染合成繊維網糸 B_1 及び B_2 群の抗張力は浸漬日数に対し，無染合成繊維漁網糸 A_1 及び A_2 群の場合と同様の経過をたどつて変化する。また破断伸度についても同様である。ただクレモナの抗張力の変化傾向が他の三者と異なるのが注目される。本多等[2]の行つた合成繊維漁網糸の日光曝露試験の結果にもこれに類似した抗張力の変化がみられるが，これについては後に論議する。試験期間中の強伸度の経過を第1及び2図に示す。

第1及び2図の上部の図は同期間における抗張力測定時の室温の概略である。海水浸漬した各網糸については強伸度測定時の乾湿球温度計の湿球の示度をもつて網糸の温度とし，これを附表2に示す。一見して抗張力は室温と対蹠的に，破断伸度は同調して増減することが知られる。そしてこのような変化のうちにも，強伸度の減少傾向が察知される。強伸度減少の程度については室内実験に徴して詳しく検討される。

II　強伸度と温度との関係

一般に漁網糸の強伸度は，漁網糸自体の性質の変化に伴つて変化する以外には，漁網糸に張力が加わる時の種々の条件に影響されて変化する。種々の条件の中では網糸の吸水状態，試長の大小，網糸に加わる力の速度，クランプの形状及び網糸の温度等がこれに影響する。海水浸漬期間中の強伸度変化は上記の最初の三

---

* 酸価は東海区水産研究所金子技官の測定になるものである。

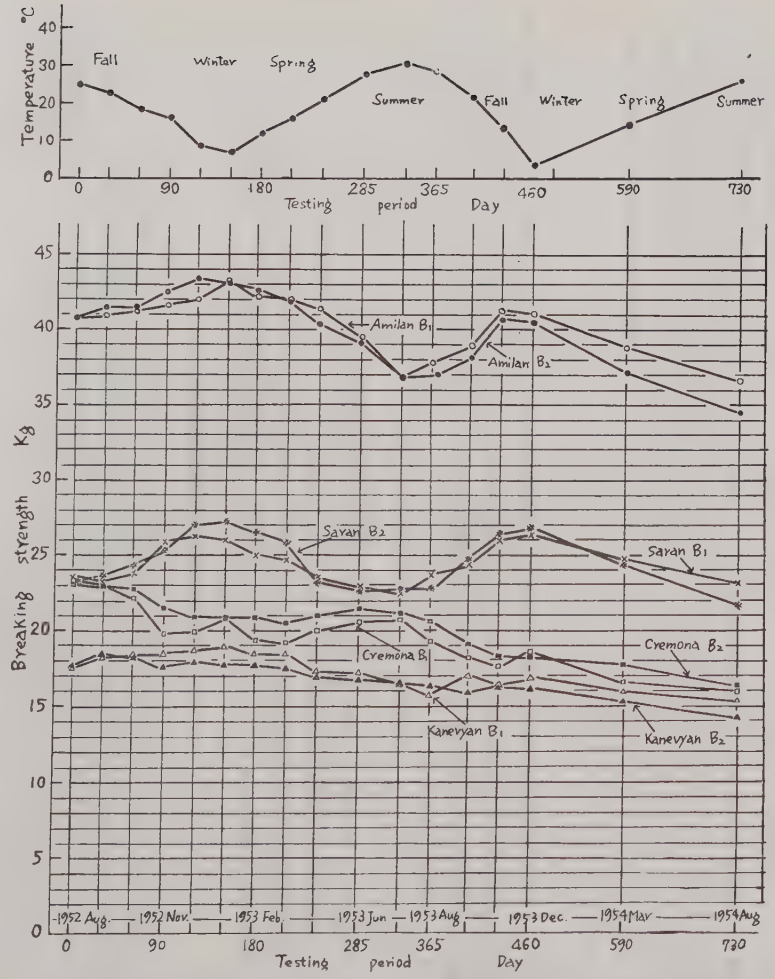


Fig. 1. Relation between the tensile strength at testing temperatures and the submerging period of the synthetic cords, B_1 and B_2 group.

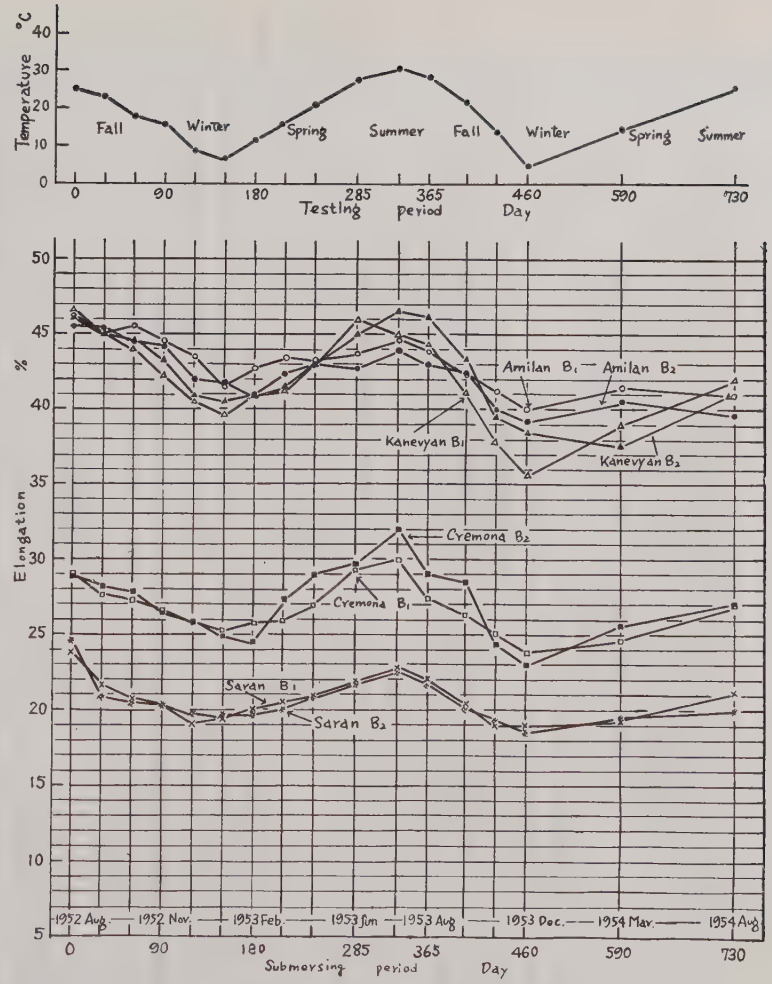


Fig. 2. Relation between the elongation at testing temperatures and the submerging period of the synthetic cords, B_1 and B_2 group.

条件を統一してあるときは最後の温度条件だけが網糸の実質的な強力変化の条件として影響すると考えられる。依つて，強伸度に対する温度支配の程度を確め，海水浸漬期間中の強伸度の真の変化を知るために，上記三条件を統一し*，3～30°C の種々の温度における同じ網糸の抗張力及び伸度を測定した。

1. 実　　験

海水浸漬試験の供試糸（コールタール染付後 3 カ月経過）を 48 時間以上水中に浸漬し，第 1 報の場合と全く同じ方法で実験した。なお，低温を得るための実験には東海区水研低温実験室が使用された。供試糸は低温状態では極めて剛く，充分乾燥してあるものは高温（25°C 以上）ではコールタールが軟化して手にくつつく程になり，極めて柔らかくなつた。

2. 結　　果

強伸度と温度との関係は第 3 及び第 4 図に示される如くで無染糸の場合の如き比例関係でないが，明らかに一定の関係があるものの如く，温度（θ）3°C から 30°C の範囲で，最小二乗法により次の実験式が得られた。

$$S_{0\theta} = a + b\theta + c\theta^2 \qquad (1) \quad 3 \leqq \theta \leqq 30$$

$$E_{0\theta} = a' + b'\theta + c'\theta^2 \qquad (2) \quad 3 \leqq \theta \leqq 30$$

ここに θ は強伸度測定時の網糸の温度，$S_{0\theta}$ 及び $E_{0\theta}$ は夫々コールタール染網糸の海水浸漬前の θ°C に

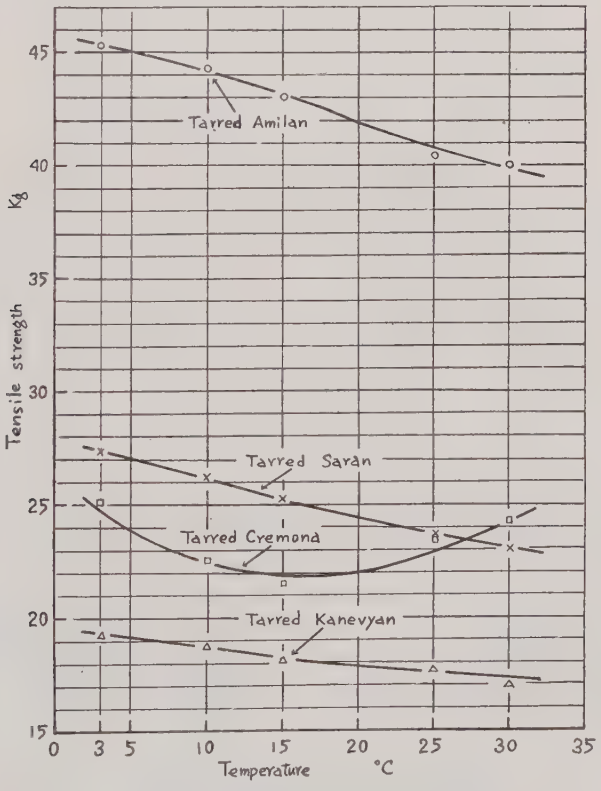


Fig. 3. Relation between the tensile strength and the temperature of the same tarred cords as in Fig. 1, but not submersed.

* 第 1 報　pp. 361

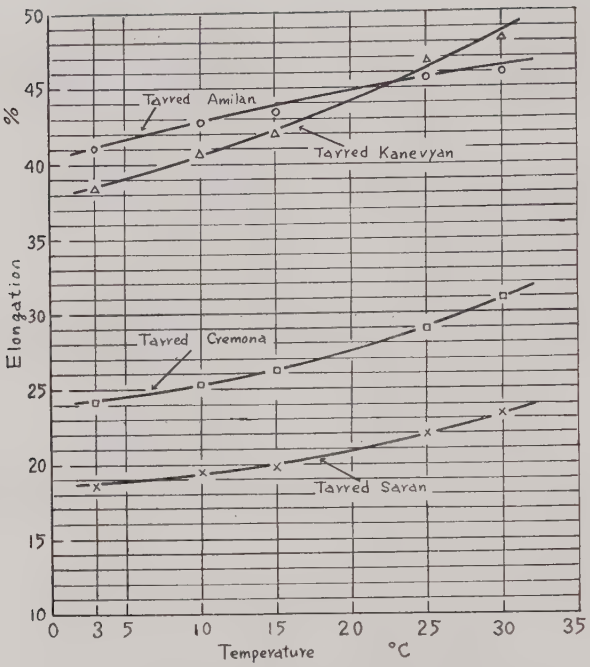


Fig. 4. Relation between the elongation and the temperature of the same tarred cords as in Fig. 2, but not submersed.

Table 1. The constants obtained by means of laboratory experiment.

Kind of cards	a	b	c	a′	b′	c′
Amilan	+46.13	−0.217	+0.000281	+40.20	+0.274	−0.00253
Cremona	+26.57	−0.558	+0.0163	+23.76	+0.103	+0.00449
Kanevyan	+19.67	−0.111	+0.00115	+38.45	+0.187	+0.00489
Saran	+28.15	−0.219	+0.00152	+18.35	+0.062	+0.00329

おける抗張力及び破断伸度である。各種網糸の a, b, c, a', b', c' 等の係数を求めて第1表に示す。なお Figs. 1 及び 2 の各温度に対応する抗張力及び伸度の数値は測定値 10 個の平均値である。このときの標準偏差は抗張力の場合 $s \leqq 0.6$ であり，伸度の場合 $s \leqq 0.8$ であつた。

コールタール染網糸のコールタールが高温時に粘性が高く流動性をあらわし，低温時に凝固し剛性を増大する事実と，網糸の引張時の抗性機構とからアミラン・カネビヤン・サラン網糸の温度と強伸度の関係が第3及び4図の如き曲線をとることは想像に難くないところであるが，クレモナの抗張力と温度の関係については物理的関係以外の関係が生ずるやにおもわれる。これらの問題については後日あらためて研究されるべきである。

Ⅲ　海水浸漬による強伸度変化の検討

海水浸漬による網糸の強伸度の変化の中には，網糸そのものの性質変化によるものと，それ以外に網糸に張力が加わるときの条件の違いに起因する変化との両方を含むことは上述の通りである。強伸度に変化を与える諸条件の中，本実験で関係するのは強伸度測定時の温度のみである。

今ここで B_1 及び B_2 群の網糸も当然強伸度と温度の関係に関して実験室に於て示されたものと同様な関係を有するものとすると* 第1表より，海水浸漬前の網糸の強伸度を任意の θ につき求めることが出来る故，海水浸漬後 i 日における網糸の任意の温度 θ における強伸度（$S_{i\theta}$, Ei_θ）と海水浸漬前の網糸のこれと同じ温度における強伸度（$S_{0\theta}$, $E_{0\theta}$）とを比較することにより，その期間中における海水浸漬網糸の真の残存強伸度を知ることが出来る。

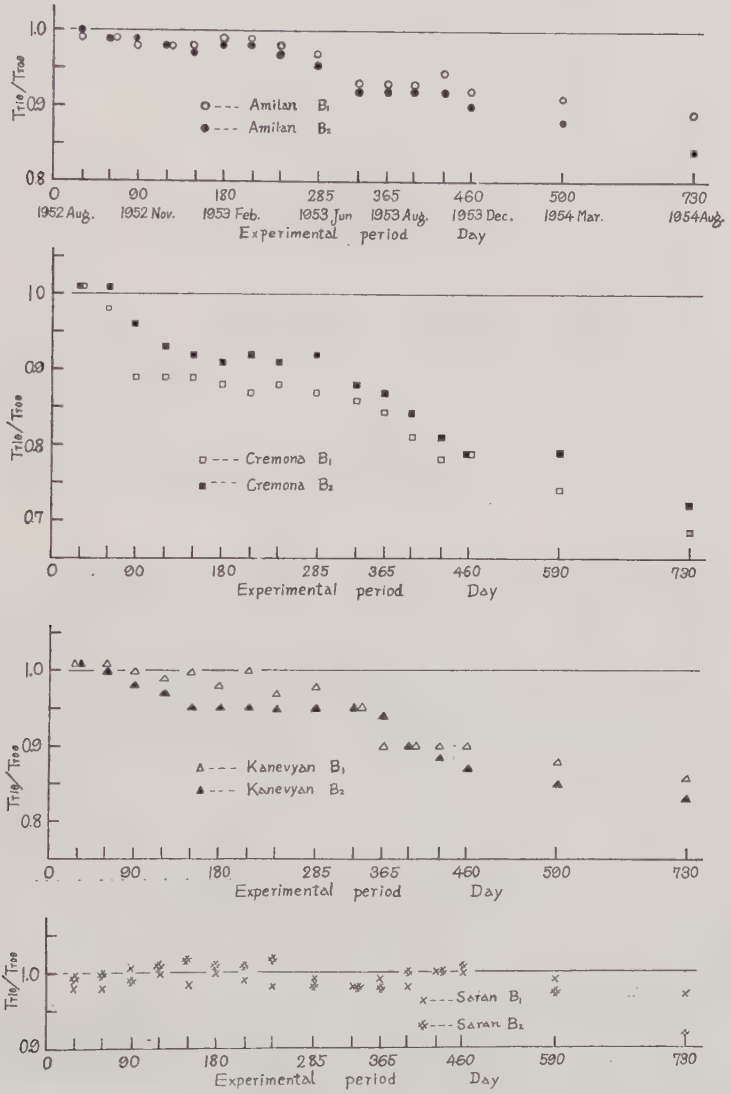


Fig. 5. Change in the tensile strength that occurred during the experimentaperiod.

* 海水中に浸漬された網糸の実験室中に保管された網糸の温度と抗張力の関係については本実験第1報の A_1, A_2 群の網糸と同時に行い，類似の関係が得られている。(Appedix Table 3 参照) 但しこれは海水浸漬された，網糸そのものについではないから，一応ここでは同期間海水中に浸漬されたもの抗張力が各温度に対してそれと同様に変化をすると仮定する。

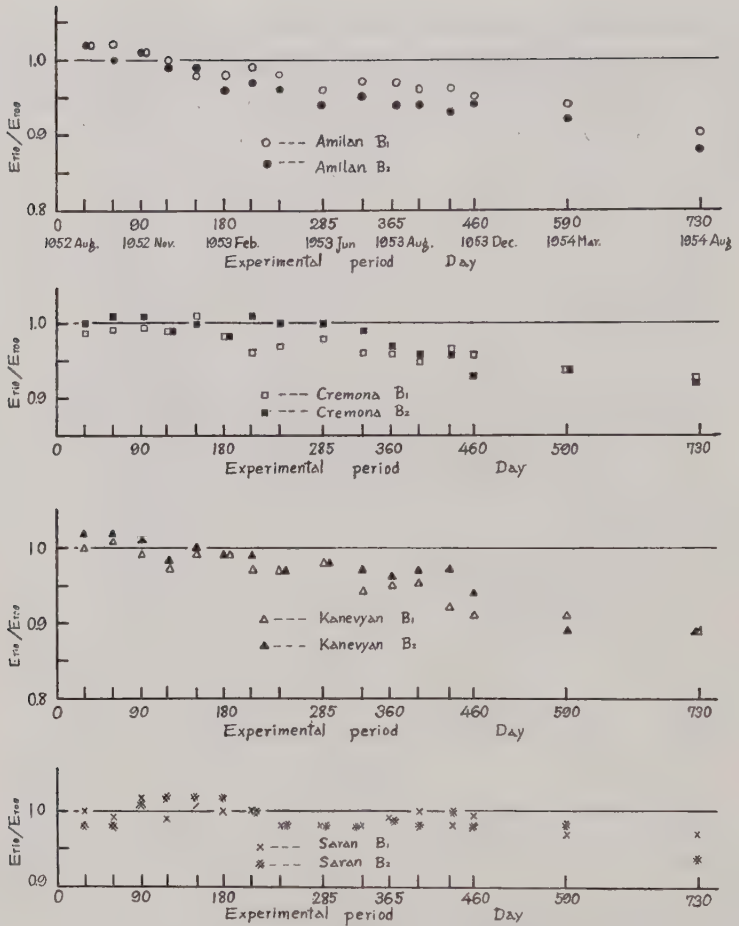


Fig. 6. Change in the elongation that occurred durring the experimental period.

$$K_i = \frac{S_{i\theta}}{S_{0\theta}} \quad \cdots\cdots(3)$$

$$K'_i = \frac{E_{i\theta}}{E_{i0}} \quad \cdots\cdots(4)$$

附表2の温度と第1表とから $S_{0\theta}$ 及び $E_{0\theta}$ を，Figs. 1, 2 より $S_{i\theta}$ 及び $E_{i\theta}$ が得られる故(3)及び(4)式により，各種網糸につき K_i 及び K'_i を求めて第5及び6図を得る。第5及び6図より海水浸漬後 460 日において，B_1 群及び B_2 群の抗張力減少率をみると，アミランとサランは夫々約 8, 0% で A_1 群及び A_2 群の減少率と比較して夫々差異がなく，又同じアミランとサランの B_1 群と B_2 群の間にも殆んど差異のないことが知られる。一方クレモナ及びカネビヤンについてみるに，夫々の B_1 群及び B_2 群間の抗張力の差異は殆んど認め難いが，A_1 群と B_1 群の間及び A_2 群と B_2 群の間の抗張力の減少は後者が前者の約2倍になつていることが注目される。海水浸漬後 460 日以降においては各種網糸につき次第に B_1 群と B_2 群の抗張力の変化の差異が大きくなる傾向にある。

同一期間についてみると B_1 及び B_2 群のアミラン，クレモナ，カネビヤン，サランの破断伸度の減少率は A_1 群及び A_2 群よりも少く，海水浸漬後 460 日において夫々，約 6, 5, 6, 2% である。コールタール染の網糸は海水浸漬中に網糸自身が収縮する傾向があり，強伸度測定時のクランプ間隔は常に一定にして

実験されることから伸度は事実より大きく表われる傾向がある。このことが破断伸度の減少が A_1 及び A_2 群のそれに較べて小さく表われた原因の1つに考慮されてよいようにおもわれる。

今ある網糸の海水浸漬後 i 日及び j 日における強度を夫々 K_i 及び K_j とすると，i 日から j 日に至る期間の平均の抗張力減少率 k_i^j は

$$k_i^j=(K_i-K_j)\frac{1}{i-j}\times 100\quad(\%)\cdots\cdots(5)$$

である。この場合 K_i 及び K_j は時間だけの函数，したがつて k_i^j も時間の函数だけと考えてよい。即ち

$$k_i^j=f_{(i,j)}\cdots\cdots(6)$$

若し i と j とが接近し $j=i+di$ と考え得るとき（5）式は

$$k_i^{i+di}=\frac{dK}{di}\cdots\cdots(7)$$

よつて

$$\frac{dK}{di}=f_{(i)}\cdots\cdots(8)$$

これを積分して

$$K=K_0+\int_0^i f_{(i)}\,di\cdots\cdots(9)$$

K_0 は最初の残存強伸度で $K_0=\dfrac{S_{0\theta}}{S_{0\theta}}=1$ であるから（9）式は

$$K=1+\int_0^i f_{(i)}\,di\cdots\cdots(10)$$

となるから仮説または理論式として $f_{(i)}$ の函数形が定まれば，任意の時期における K より，そのときの抗張力減少率を求めることが出来る。

現在の場合はこの函数形の決定が困難であるので，これらの網糸の隣接する期間の抗張力測定毎に求められる K の値より，（5）式により k を計算し附表4を得る。破断伸度についても同様に取扱うと

$$k'^j_i=(K'_i-K'_j)\frac{1}{j-i}\times 100\quad(\%)\cdots\cdots(11)$$

$$K'=1+\int_0^i \varphi_{(i)}\,di\cdots\cdots(12)$$

(11) 式より抗張力のときと同様にして k' を求めて第5表を得る。(k'^j_i は海水浸漬後 i 日より j 日に至る期間の破断伸度の平均減少率である)。

k は海水浸漬網糸の抗張力の変化率と考えてよい。得られた k の値を各期間を季節毎にこみにしその値 k_s みると，サランは抗張力の変化が小さいので，はつきりした傾向がつかめないが，アミラン及びカネビヤンでは B_1, B_2 群共に夏期に抗張力の減少率が高く，冬期に低く，クレモナは夏期より初冬にかけて減少率が大きく，冬の終りから春にかけては減少率が小さい。そしてこのような傾向は B_2 群においてより顕著であることに対しては太陽の紫外線の影響が最も大きく考えられ，これについで波浪の影響が考えられる。またタール内容物の影響があるとすれば，海水温の高さも関係があるかも知れない(附表1参照)。サランは海水浸漬後180日頃よりコールタールが離脱しはじめ，試験後半では，コールタールの影響を余り多く受けなかつたようにおもわれる。

破断伸度の変化 k' は時期的に特別の傾向がみられず，一般的には海水浸漬後 280 日から 365 日までの間と 460 日から 600 日との間で減少率が高い。抗張力の変化率と伸度の変化率が高い時期のずれの原因究明は今後に残される。

摘　　要

1．コールタール染合成繊維網糸の海水浸漬（B_1 群）及び海水浸漬と風日乾の繰返し（B_2 群）を連続的に行い，それらの抗張力 $S_{i\theta}$ 及び伸度 $E_{i\theta}$ が変化する経過を明らかにした。

2．これらの網糸の強伸度の変化は網糸自身の性質変化の外に，網糸に張力が働くときの温度に影響されると考え，同じ供試糸につき，抗張力 $S_{0\theta}$ 並びに伸度 $E_{0\theta}$ と温度 θ との関係を実験によつて確め，その関係を次の如き実験式によつて示した。

$$S_{0\theta}=a+b\theta+c\theta^2\qquad 3\leqq\theta\leqq 30$$

$$E_{0\theta}=a'+b'\theta+c'\theta^2\qquad 3\leqq\theta\leqq 30$$

3．糸 B_1 及び B_2 群の網糸の抗張力 $S_{i\theta}$ 及び伸度 $E_{i\theta}$ も2と同様に温度によつて変化する函数と考えられるから，同一の温度についての任意の時期 i 日における強伸度変化 K, K' は

$$K_i = \frac{S_{i\theta}}{S_{0\theta}} \qquad K'_i = \frac{E_{i\theta}}{E_{0\theta}}$$

4. 海水浸漬期間の強度の変化率 k, k' は理論的には

$$K = K_0 + \int_0^i f_{(i)}\,di \qquad K' = K'_0 + \int_0^i \varphi_{(i)}\,di$$

によつて任意の時期につき求められるが，本実験の場合は

$$k_i^j = (K_i - K_j)\frac{1}{i-j} \times 100 \quad (\%)$$

$$k'^j_i = (K'_i - K'_j)\frac{1}{i-j} \times 100 \quad (\%)$$

として，抗張力及び伸度の測定毎の隣接する期間 i, j についての平均の強伸度減少率を求め，季節毎の抗張力並びに伸度の変化率の高低について考察した。

終りに臨み本実験を指導していただいた本所宮本科長，御校閲いただいた高山部長並びに源生所長の各氏に深甚の謝意を表する。また現場で御協力いただいた平井政治氏に深謝する。

文　　献

1) 下崎吉矩: 本誌, 20, 359 (1954).
2) K. HONDA, T. KTIKUCHI & I. OKADA.: J. Tokyo Uni. Fish, 43, 199 (1957).

Appendix table 1. Average sea-water temperature by month at the field and frequency for immersing and drying of the cords from January of 1954 to the end of the field test.

Month(1954)	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Fal.	Aug.
Averagewater temp. (°C)	16.0	14.2	14.6	15.5	18.2	21.7	23.8	26.0
Frequency of immersing and drying	8	6	7	8	8	7	9	8

Appendix table 2. The temperature (°C) of laboratory when their strength was tested after the submergences.

Group	Kind of cords	Duration of submergence (days) 30	60	90	120	150	180	210	240	285	330	365	400	430	460	590	730
B_1 group	Amilan	22	20	16	14	10	15	16	19	24	30	26	18	11	7	16	23
	Cremona	22	20	17	14	9	15	18	21	27	29	24	20	13	8	15	25
	Kanevyan	22	19	17	14	9	13	14	21	27	28	24	18	13	6	16	25
	Saran	23	20	14	10	8	15	17	22	27	29	27	17	10	8	15	24
B_2 group	Amilan	20	19	15	10	8	10	15	20	26	30	27	21	9	6	17	24
	Cremona	22	19	14	14	11	10	17	24	26	28	27	23	11	8	19	24
	Kanevyan	20	18	16	13	10	12	14	21	26	28	27	22	11	8	15	24
	Saran	22	20	13	8	7	10	14	23	27	28	26	18	10	7	15	22

Appendix table 3. The constants obtained by means of laboratory experiment of the cords having been put in the laboratory during the all experimental perid, 730 days.

Kind of cords	a	b	c	a′	b′	c′
Amilan	+43.90	−0.179	+0.000787	+36.79	+0.519	−0.00991
Cremona	+24.97	−0.533	+0.0132	+18.80	+0.191	+0.000628
Kanevyan	+16.47	−0.0967	+0.00141	+33.09	+0.211	+0.00259
Saran	+27.26	−0.240	+0.00181	+19.35	+0.0902	+0.000940

Appendix table 4. Mean proportion of the change in the strength of the sea-submersed cords of B_1 and B_2 group, k (%).

	Season		Fall			Winter			Spring			Summer		Fall			Winter	Spring summer
	Period of submergence (days)		0	−30	−60	−90	−120	−150	−180	−210	−240	−285	−330	−365	−400	−430	−460	−690	−730
k on B_1 group	Amilan	$K_i - K_j$	1		0	1	0	0	−1	0	1	1	4	0	0	−2	2	1	2
		$\frac{1}{j-i}(K_i - K_j)$	0.0333		0	0.0333	0	0	−0.0333	0	0.0333	0.0222	0.0890		0	−0.0333	0.0666	0.0071	0.0154
		k			0.0222			−0.0111			−0.0184			0.0445			0.0111		0.0071	0.0154
	Cremana	$K_i - K_j$	−1		3	9	0	0	1	1	−1	1	1	2	3	3	−1	5	6
		$\frac{1}{j-i}(K_i - K_j)$	−0.0333		0.1000	0.3000	0	0	0.0333	0.0333	−0.0333	0.0222	0.0222	0.0573	0.0750	0.1000	0.0333	0.0357	0.0462
		k			0.1222			0.0111			0.0074			0.0398			0.0472		0.0357	0.0462
	Kanevyan	$K_i - K_j$	−2		0	2	1	−1	2	−2	3	−1	3	5	0	0	0	2	2
		$\frac{1}{j-i}(K_i - K_j)$	0.0666		0	0.0667	0.0333	−0.0333	0.0667	−0.0667	0.1000	−0.0222	0.0667	0.1670	0	0	0	0.0143	0.0154
		k			0			0.0222			0.0037			0.1169			0		0.0143	0.0154
	Saran	$K_i - K_j$	2		0	−3	1	2	−2	1	1	−1	1	−1	1	−2	0	1	2
		$\frac{1}{j-i}(K_i - K_j)$	0.0667		0	−0.1000	0.0333	0.0667	−0.0667	0.0333	0.0333	0.0222	0.0222	−0.0285	0.0285	−0.0667	0	0.0072	0.0154
		k			−0.0111			0.0111			0.0144			−0.0032			−0.0126		0.0072	0.0154
k on B_2 group	Amilan	$K_i - K_j$	0		1	0	1	1	−1	0	1	1	4	0	0	0	2	2	4
		$\frac{1}{j-i}(K_i - K_j)$	0		0.0333	0	0.0333	0.0333	−0.0333	0	0.0333	−0.0222	0.0890	0	0	0	0.0667	0.0143	0.0308
		k			0.0111			0.0111			0.0185			0.0445			0.0222		0.0143	0.0308
	Cremona	$K_i - K_j$	−1		0	5	3	1	1	−1	2	−2	4	1	3	3	2	0	7
		$\frac{1}{j-i}(K_i - K_j)$	−0.0333		0	0.1667	0.1000	0.0333	0.0333	−0.0333	0.0667	−0.0445	0.0890	0.0285	0.0858	0.1000	0.0667	0	0.0538
		k			0.0445			0.0555			−0.0185			0.0588			0.0841		0	0.0538
	Kanevyan	$K_i - K_j$	−2		2	2	1	2	0	0	0	0	0	1	4	1	2	2	2
		$\frac{1}{j-i}(K_i - K_j)$	−0.0667		0.0667	0.0667	0.0333	0.0667	0	0	0	0	0	0.0285	0.1143	0.0333	0.0667	0.0143	0.0154
		k			0.0222			0.0333			0			0.0143			0.0714		0.0143	0.0154
	Saran	$K_i - K_j$	2		−2	1	−3	1	0	−1	4	0	0	0	−2	0	−1	3	6
		$\frac{1}{j-i}(K_i - K_j)$	0.0667		−0.0667	0.0333	−0.1000	0.0333	0	−0.0333	0.1333	0	0	0	−0.0571	0	−0.0333	0.0214	0.0461
		k			0.0111			−0.0222			0.0332			0			−0.0301		0.0214	0.0461

Appendix table 5. Mean proportion of the change in the strength of the sea-submersed cords of B_1 and B_2 group, k' (%).

	Season		Fall			Winter			Spring			Summer		Fall			Winter	Spring Summer
	Period of submergence (days)		0	−30	−60	−90	−120	−150	−180	−210	−240	−285	−330	−365	−400	−430	−460	0	−600	−730
k' on B_1 group	Amilan	$K_i' - K_j'$		−2	0	1	1	2	0	−1	1	2	−1	0	1	0	1	1	4
		$\frac{1}{j-i}(K_i' - K_j')$		−0.0667	0	0.0111	0.0333	0.0667	0	−0.0333	0.0333	0.0445	−0.0222	0	0.0333	0	0.0333	0.0072	0.0308
		k			−0.0111			0.0333			0.0148			−0.0111			0.0222		0.0072	0.0308
	Cremona	$K_i' - K_j'$		2	−1	0	0	−2	3	2	−1	−1	2	0	1	−2	1	2	1
		$\frac{1}{j-i}(K_i' - K_j')$		0.0667	−0.0333	0	0	−0.0667	0.1000	0.0667	−0.0333	−0.0222	0.0445	0	0.0333	−0.0667	0.0333	0.0143	0.0077
		k			0.0111			0.0111			0.0039			0.0223			0		0.0143	0.0077
	Kanevyan	$K_i' - K_j'$		2	−1	2	2	−2	0	0	2	−1	4	−1	0	3	2	−1	2
		$\frac{1}{j-i}(K_i' - K_j')$			−0.0333	0.0667	0.0667	−0.0667	0	0	0.0667	−0.0222	0.0890	−0.0285	0	0.1000	0.0333	−0.0072	0.0154
		k			0.0111			0			0.0149			0.0303			0.0556		−0.0072	0.0154
	Saran	$K_i' - K_j'$		0	1	−3	3	−2	1	0	2	0	0	−1	−1	2	−1	2	0
		$\frac{1}{j-i}(K_i' - K_j')$			0.0333	−0.0667	0.1000	−0.0667	0.0333	0	0.0667	0	0	−0.0285	−0.0333	0.0667	−0.0337	0.0143	0
		k			−0.222			0.0222			0.0222			0.0143			0		0.0143	0
k' on B_2 group	Amilan	$K_i' - K_j'$		−2	2	−1	2	0	3	−1	1	2	−1	1	0	1	−1	2	4
		$\frac{1}{j-i}(K_i' - K_j')$		−0.0667	0.0667	−0.0333	0.0667	0	0.1000	−0.0333	0.0333	−0.0445	−0.0222	0.0285	0	0.0333	−0.0333	0.0143	0.0308
		k			−0.0111			0.0556			−0.0148			0.0031			0		0.0143	0.0304
	Cremona	$K_i' - K_j'$		−1	−1	0	2	−2	3	−3	1	0	1	2	1	0	3	−1	2
		$\frac{1}{j-i}(K_i' - K_j')$		−0.0333	−0.0333	0	0.0667	−0.0667	0.1000	−0.1000	0.0333	0	0.0222	0.0573	0.0333	0	−0.1000	−0.0072	0.0154
		k			−0.0222			0.0333			−0.222			0.0398			0.0444		−0.0072	0.0154
	Kanevyan	$K_i' - K_j'$		−2	0	1	3	−2	1	0	2	−1	1	1	−1	0	3	5	0
		$\frac{1}{j-i}(K_i' - K_j')$		−0.0667	0	0.0333	0.1000	−0.0667	0.0333	0	0.0667	−0.0222	0.0222	0.0285	−0.0333	0	0.1000	0.0357	0
		k			−0.0111			0.0222			0.0149			0.0254			0.0222		0.0357	0
	Saran	$K_i' - K_j'$		2	0	−4	0	0	0	2	−2	0	0	−1	1	−2	2	0	4
		$\frac{1}{j-i}(K_i' - K'_j)$		0.0667	0	−0.1333	0	0	0	0.0667	−0.0667	0	0	−0.0285	0.0333	−0.0667	0.0667	0	0.0308
		k			−0.0222			0			0			−0.0143			0.0111		0	0.0308

長繊維漁網糸の摩擦に対する強さ—I.

下崎吉矩・加藤春己*
(東海区水産研究所)

On the Wear Resistance in Continuous Filament-Twines—I.

Yoshinori Shimozaki and Harumi Kato

Among various physical properties of fishing net twines, wear resistance seems to be affected by the number of twists given to yarn, strand and twine. In the present study the sample twines used were the same in quality (vinyle chloride synthetics, Teviron, 300 deniers $ZN_1 \times SN_2 \times ZN_3$) and in number of yarns of which they consisted. But they differed one another in number of twists given to yarn, strand and cord as shown in Table 1. When the breaking strength of a material rubbed n times with an apparatus (Fig. 1) is represented by T_n, and that of a non-rubbed material by T_0, one may denote the wear resistance as T_n/T_0 for comparing it among the differently twisted samples. The results obtained are summarized as follows.

1) There is much difference in the wear resistance (T_n/T_0) even in the same quality of the synthetic twines (Fig. 2 and Table 1).
2) It has been recongnized that the difference in the wear resistance among these twines tested is concerned with the number of the second twists (N_2) of the twines (Table 2).
3) Neither the weight nor the diameter of the twines seems to affect the wear resistance.
4) There are marked differences in rigidity closely related the 2nd twist (N_2) but hardly with the 1st and the 3rd twists (N_1, N_3) (Fig. 3). See the foot note under Table 1 concerning for N_1, N_2 and N_3.
5) Relationship between coefficient of the friction and either the rigidity or the wear resistance had an inclination inverse from each other: the smaller the coefficient of friction, the greater is the rigidity as well as the wear resistance (Figs. 5 and 6).
6) On the other hand, a high correlation has been noticed between the wear resistance and rigidity of the tested twines (Fig. 4).
7) It is inferable that the differences in the wear resistance are primarily attributed to the number of twists, and in the present case, 2nd twists, as the twists govern the rigidity which in turn affects coefficient of friction.
8) It is doubtful, however, whether or not the number of 2nd twists is the only factor that always increases the rigidity and decreases the coefficient.

漁網糸の摩擦に対する強さ**については既に幾多の研究が報告されているが[1),2),3),4),5),6)]，それらは主として漁網糸の性能を一次的に支配すると考えられる原繊維の異質性を問題とした異種漁網糸間の耐摩強度の比較を取扱つたもののようである。しかし，漁網糸の性能はその一次的要素以外に，これに加えられている撚によつて二次的に著しく影響を与えられるものと考えられ，諸性能の中，抗張力に関してはこの問題について多くの研究がある[7),8),9),10),11),12),13)]。耐摩強度は漁網糸の性能の中で比較的重要な地位を占めるものとおもわれるが，未だこの二次的要素の影響について報告された研究は殆んどないようである。

漁網の性能を厳正に評価し，向上させ，合理的に使用するためには，漁網糸の諸性能に対する撚の影響の大いさと原因について先ず充分の解明が行われることが必要である。このような観点から著者等は長繊維漁

1958 年 10 月 14 日受理　東海区水産研究所業績 B 第 302 号
* 加藤春己　現在，秋田県庁水産課
** この強さを以後において耐摩強度と呼ぶ。

網糸の耐摩強度と撚の関係につき実験し，その結果につき二三検討を行つたのでこれを報告する。

I. 実験材料及び方法

1. 実験材料： 実験に用いられた材料は，一定長 (30 cm) の撚糸 (twine) の中にある下撚数 (N_1)，中撚数 (N_2)，上撚数 (N_3) が夫々第1表に示される 300 denier 9/3 のテビロン漁網糸 25 通りと，これと比較するために加えられた 20's 9/3 のクレモナ及び綿漁網糸各1通りである。この二者は何れも並撚と称せられるものである。

2. **実験方法**： 供試糸は第1図に示される装置によつて所定回数 (n) 摩擦された後 Schopper system tensile strength tester によりその残存抗張力が測定された。この残存抗張力 T_n と摩擦前の抗張力 T_0 との比 T_n/T_0 を摩擦に対する強さの測度（耐摩強度）とする。摩擦テストの外に，これら供試糸間の耐摩強度の差異の原因について検討するために，供試糸の直径・長さ 1 m の重量・長さ 30 cm 間の撚数・剛軟度及び摩擦係数が測定された。

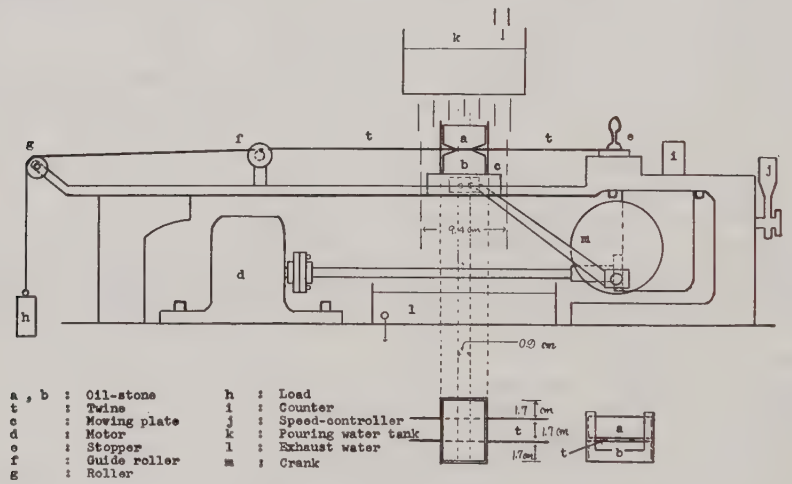


Fig. 1. Testing apparatus.

供試糸を摩擦するのに用いた実験装置は第1図に示される如き Duplan system cohesion machine を実験に適当するよう改造したものである。試料糸 (t) は摩擦物体 (a), (b) の間にはさまれ，(a) の重力と (b) の抗力による摩擦圧を受けて上，下両面が同時に摩擦される。(a) の下面と (b) の上面は共に水平面をなし，常時 (t) と接触を保つ部分の長さは 0.9 cm である。(a), (b) の材質は oil-stone，その重量は各 200 gr，左右に動揺しないように亜鉛板の枠に納められている。(この部分は第1図の下方に別に図示した。) (a), (b) が納められている枠は移動台 (c) 上に固定され，(c) は motor (d) より crank (m) を経て 24 cm/sec の平均速度で往復運動（この運動は Simple oscillation である。）する。試料糸 (t) は (a), (b) の間に，その両端よりそれぞれ 1.7 cm のところに1本ずつはさまれて（第1図の下方の別図参照）摩擦される。移動台 (c) の移動距離は 9.4 cm である。摩擦回数は移動台の一往復が摩擦1回として計数器 (i) に記録される。摩擦速度は (j) によつて調整される。試料糸を緊張させるためにその一端に 300 gr の荷重 (h) を加えた。また摩擦行程中に試料糸の内部に摩擦熱が蓄積するのを防ぐために図の如く水槽 (k) を設け，その底部の多数の小孔から 17 ± 1°C に保たれた清水を平均 25 cc/sec の割で摩擦部位に注水した。

検撚には松井式単糸検撚機を用い，twine の長さ 30 cm につきその上，中，下の各撚数を測定した。

抗張力測定時の引張速度は 0.3 cm/sec，試料糸は湿潤状態で，水温 17 ± 1°C，室温は 16 ± 2°C であつた。

重量測定は試料糸の乾燥状態のものにつき，300 gr の荷重下における長さが 100 cm の重量を記録した。

Table 1. Specification of the Material and the Determined Values

No.	No. of twist per length 30 cm N_1*	N_2*	N_3*	Weight per 100 cm gr	Diameter mm	Rigidity gr	T_0** kg	N_{20}** kg	T/T_{20}	T_{80}** kg	T_{80}/T_0	T_{160}** kg	T_{160}/T_0	T_{200}** kg	T_{200}/T_0
1	169.2	195.6	105.6	0.375	0.47	1.65	6.5	6.4	0.98	5.9	0.91			5.0	0.77
2	102.0	230.4	107.8	0.409	0.50	1.60	7.5	7.3	0.97	6.8	0.90			5.6	0.75
3	175.2	231.6	111.6	0.367		1.67	6.7	6·5	0.97	5.9	0.88	5.3	0.79	5.0	0.75
4	280.8	254.4	111.6	0.406		1.58	6.5	6.1	0.94	5.5	0.85			4.8	0.74
5	278.8	252.0	102.0	0.379	0.50	1.68	6.8	6.4	0.94	5.5	0.81			5.1	0.75
6					0.50		6.6	6.2	0.94	5.6	0.85			4.8	0.73
7	168.0	229.2	99.6	0.414	0.57	1.83	7.6	7.2	0.95	6.5	0.86			5.4	0.71
8	104.4	236.4	98.4	0.400	0.52	1.72	8.0	7.4	0.93	6.8	0.85			5.6	0.70
9	171·6	221.2	90.0	0.367	0.50	1.50	7.1	6.6	0.93	6.0	0.84			5.0	0.70
10	202.8	189.6	86.4	0.415	0.59	1.42	7.3	6.6	0.91	6.1	0.84			4.8	0.66
11	104.4	230.4	86.4	0.366	0.50	1.54	7.1	6.5	0.92	5.8	0.82			4.6	0.65
12	99.6	153.6	98.4				6.9			5.9	0.85			4.5	0.65
13							6.2			5.1	0.84			3.8	0.61
14	260.4	153.6	98.4	0.400	0.53	1.29	6.2	5.6	0.90	4.8	0.77	4.1	0.61	3.7	0.58
15	108.0	156.0	108.0				6.9			5.6	0.81			3.6	0.52
16	96.0	156.0	108.0				7.0			5.4	0.77			3.6	0.51
17	102.0	102.0	72.0	0.388	0.50	1.23	8.1	7.4	0.91	5.7	0.70			3.2	0.40
18	98.4	102.0	78.0	0.380	0.47	1.15	6.2	5.7	0.92	4.6	0.74	2.8	0.45	2.6	0.38
19	165.6	99.6	91.2	0.376	0.47	0.88	7.1	6.4	0.90	4.3	0.61	2.5	0.42	2.1	0.29
20	158.4	102.0	90.0	0.376	0.47	0.87	7.2	6.4	0.89	4.4	0.60	1.2	0.24	1.3	0.18
21	168.0	104.4	89.2	0.376	0.53	0.69	6.7	5.8	0.87	3.9	0.58	1.5	0.22	0.7	0.11
22							7.3	6.1	0.84	4.0	0.56				
23							6.8	4.9	0.72	3.1	0.46				
24	272.4	108.0	92.4	0.407	0.53	0.82	6.6	4.5	0.68	2.3	0.35				
25							7.0	3.8	0.54	1.3	0.19				
26***	228.0	282.0	86.4	0.396			6.8	5.8	0.85	4.5	0.64	3.2	0.46		
27***	105.6	216.0	74.4	0.336			6.4	5.7	0.89	4.4	0.69	3.1	0.48		

* N_1, N_2 and N_3 show the numbers of twist for yarn, strand and twine, respectively.

** T_0, T_{20}, T_{80}, T_{160} and T_{200} show tensile strength of the twine rubbed 0, 20, 80, 160, and 200 times, respectively.

*** The specimens from No. 1 to No. 25 are the teviron twine, and No. 26 and No. 27 cotton and cremona.

直径についても同様な条件のもとにおいて読取顕微鏡により測定した。

剛軟度は三善の方法[14]によつた。Edge 間隔は 10.0mm, ring の径は 1.5cm のものを用い，試料の長さは 2.0cm とした。

摩擦係数は，試料糸を摩擦するときと同様に準備し，第1図において，荷重 (h) 300gr の代りに水を容れることのできる容器を吊し，stopper (e) と (a), (b) との間に試料糸を少しくたるませ，容器に徐々に水を注入したとき，試料糸の動きはじめるときの容器と水の重量を摩擦力として求めた。即ち容器と水の重量の和を F (摩擦力) とすると油砥石 (Fig. 1 の (a)) が 200gr であるとき，摩擦係数 $\mu=\frac{1}{2}\cdot\frac{F^*}{200}$ である。

以上の測定結果として第1表に記載されたものは総て試料 10 についての測定値の算術平均である。

II. 実験結果と考察

1. 耐摩強度 T_n/T_0: 供試糸の最初の抗張力を T_0 とし，n 回摩擦後の抗張力を T_n とするとき，耐摩強度は T_n/T_0 で表わされるものとし，n がそれぞれ 20, 80, 160, 200 の場合につき各供試糸の T_n/T_0 を求めた。各供試糸につき T_{200}/T_0 の値の大きさの順に No. 1～No. 25 の番号をつけ第1表に実験結果を示す。これらの下の段にクレモナ及び綿網糸の T_n/T_0 を併記した。

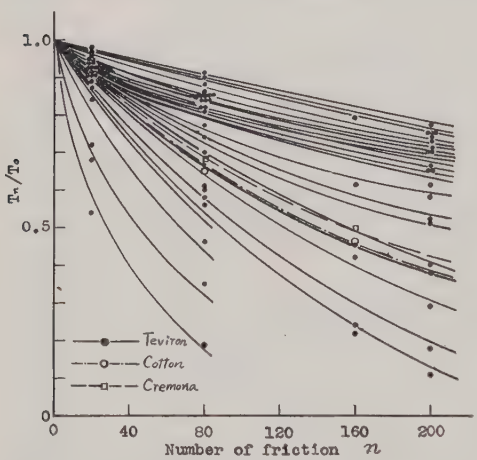


Fig. 2. The decreases in wear resistance of the netting twines, (T_{200}/T) related to the number of friction n. Cotton and cremona twine are of medium twist, and the teviron twines have different number of twists ranging soft to extrahard ones as shown in Table 1.

Table 2. Some examples of the constants in the exponential curve, $T_n/T_0{}^*=e^{bn}$

No. of specimen	$b=-\frac{1}{T_n/T_0}\cdot\frac{d(T_n/T_0)}{dn}$
3	0.00149
8	0.00246
14	0.00353
18	0.00450

* T_n/T_0: Wear resistance.
n: Number of friction.

T_n/T_0 と摩擦回数との関係は第2図に示される如くで，$T_n/T_0=f_{(n)}$ とするとき，ほぼ $f_{(n)}=ae^{-bn}$ なる曲線に沿つて減少するものとみられる ($b>0$)。$T_n/T_0=f_{(n)}$ より $f_{(0)}=1$ であるから，$f_{(n)}=ae^{-bn}$ において $a=1$ であるべきである。したがつて $f_{(n)}=e^{-bn}$ となるから，b の大きいものは耐摩強度が小さい。いくつかの標本につき b を求めて第2表に例示する。

また，この曲線は $\frac{df_{(n)}}{dn}=be^{-bn}$ で n が大なる程耐摩強度の減少する割合が小さくなることを示している。

$f_{(n)}$ のこのような減少傾向は，漁網糸の磨損が単に漁網糸自体に対する仕事量の大いさに関係するだけでなく，被摩擦面の単位面積当りの圧力にも強く支配されることを示唆するものと考えられる。

クレモナ及び綿糸標本糸の $T_n/T_0=f_{(n)}$ もテビロン試料糸とほぼ同じ曲線に沿つて減少し，その大いさはテビロン No. 1 から No. 25 の標本のほぼ中程に位し，撚数の如何によつて，互いに大きい場合も小さい場合もあり得ることを示した。

2. 耐摩強度に及ぼす撚の影響: 第2図から同種の原糸よりなる同一構成の漁網糸の耐摩強度に非常に大

---

* $\mu=\frac{1}{2}\cdot\frac{F}{200}$ で μ を $\frac{F}{200}$ の $\frac{1}{2}$ としたのは Fig. 1 で a, b の石に試験糸が2本はさまれているからである。

きな差異のあることが知られるが，これらの試料はその上撚*，中撚，下撚の各撚数が異なるだけであるから，このような耐摩強度の差異はその大部分がこれら撚数の相違に起因するものとみることができる**。

供試糸の耐摩強度は $f_{(n)}=e^{-bn}$ について論じられるべきであるが，ここでは簡単のために T_{200}/T_0 をその供試糸の耐摩強度として代表させ，これと上，中，下各撚数との関係をみる。第3表にその分散分析***の結果を示す。

第3表によると，中撚 N_2 は T_{200}/T_0 に顕著な影響を及ぼすが，他の撚 N_1, N_3 はこの場合余り positive ではなく，各撚の交互作用も T_{200}/T_0 の大いさに影響する程強くはないことが推察される。

Table 3. Analysis of variance in the mean strength of the twines classified by numbers of the 1st, the 2nd and the 3rd twist

Source of variation	*d.f.*	Mean square
N_3*	2	84.3889
N_2	1	14450.0000
N_1	2	214.8889
$N_3 \times N_2$	2	246.1667
$N_3 \times N_1$	4	52.7223
$N_2 \times N_1$	2	340.6667
$N_1 \times N_2 \times N_3$	4	93.3333

* N_1, N_2 and N_3 denote respectively the 1st, the 2nd and the 3rd twist.

3. 供試糸の性状と耐摩強度：　漁網糸間に撚数の相違だけがあるとき，それらの間に生ずべき static な性質の相違として，直径，重量，摩擦係数，剛軟度等があげられる。漁網糸間の耐摩強度の差異は，これらの諸性質の相違に起因するものとみて，それらと耐摩強度との関係及びそれら相互間の性質の関係について実験した結果次のことが知られた。

1)　直径及び重量と耐摩強度　　第1表に記された測定結果より，直径の大小は耐度強度に全く関係なく，単位長さの重さにも殆んど影響されないとみられる（$r_w=+0.2558$, $t=1.0392$, $d.f=15$）。

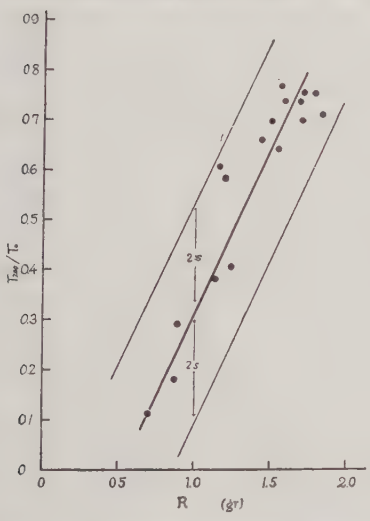


Fig. 3. Relation between the wear resistance and the rigidity of the twines.
T : Tensile strength of a twine.
T_{200}: Tensile strength of twines after abrading 200 times.

2)　剛軟度と耐摩強度　　剛軟度 R と T_{200}/T_0 との関係は第3図にみられる如く，両者の間に可成り高い相関がみられ，これは $T_{200}/T_0=0.657R-0.34$ をもつて推定される回帰を有する。T_{200}/T_0 の varians は第4表に例示した。

Table 4. Example of variance in T_{200}/T_0 for same kinds of the twines differing in number of twists

No.	N_1	N_2	N_3	T_0 kg	σ_{T_0}	T_{200}	σ_{T200}	$\sigma_k{}^2$*
2	102.0	230.4	107.8	7.5	0.2301	5.6	0.1934	11.8652
9	171.6	221.2	90.0	7.1	0.1372	5.0	0.4814	9.6267
11	104.4	230.4	86.4	7.1	0.2164	4.6	0.1351	7.5492
17	102.0	102.0	72.0	8.1	0.1583	3.2	0.2341	4.6367

* $k=T_{200}/T_0$ のとき

$$\sigma_k{}^2=k^2\left\{\left(\frac{\sigma_{T_0}}{T_0}\right)^2+\left(\frac{\sigma_{T200}}{T_{200}}\right)^2\right\}-2\rho\,\frac{\sigma_{T_0}\sigma_{T200}}{T_0T_{200}}$$

一方剛軟度と撚数との関係をみると，第4図に示される如く，ここでも中撚 N_2 と剛軟度 R との間に正の相関がみられ（$r_{R\cdot N_2}=+0.8850$, $t=7.3620$, $d.f=15$），上，下各撚数（N_3, N_1）と R と

---

* 上撚，中撚，下撚は第1表ではそれぞれ N_3; the 3rd, N_2; the 2nd 及び N_1; the 1st twist に相当する。

** 原糸，単糸，片子糸等の引揃えの均一性やこれら構成単位の摩擦物体とのなす角度にも影響を受けるかも知れないが，ここではこれを無視する。

*** T_{200}/T_0 の分散は $\sigma_k{}^2=k^2\{(\sigma_{T_0}/T_0)^2+(\sigma_{T_{200}}/T_{200})^2\}-2\rho\sigma_{T_0}\sigma_{T_{200}}/T_0T_{200}$ によつて推定した。ここで $k=T_{200}/T_0$

の間の相関は非常に低い ($r_{R\cdot N_3} = +0.3508$, $t = 1.4520$, $d.f = 15$, $r_{R\cdot N_1} = +0.2111$, $t = 0.86369$, $d.f = 15$)。

以上の二つの関係から，供試漁網糸間の T_{200}/T_0 の差異は主として N_2 の大いさ如何によつて生じた試料糸の剛軟度の大小に基いたものであると推察される。

3) 摩擦係数と耐摩強度　2) において，これらの供試糸の耐摩強度は剛軟度の増大に伴つて大きくなる傾向をもつていることが知られた。このような関係を両者の間に生ぜしめる物理的素因としては摩擦係数 μ が考えられる。

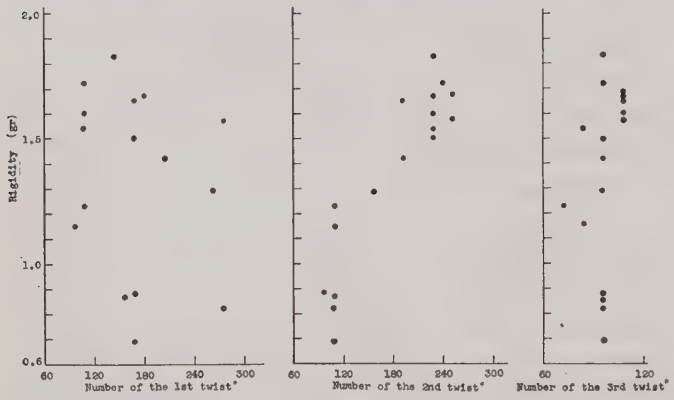


Fig. 4. Relation between the number of twists and ridigity of the twines.
The 1st, the 2nd and the 3rd twists denote the ones given to a yarn, strand and twine, respectively.

そこで T_{200}/T_0 と μ との関係をみると第5図の如く逆の相関的関係がみられる。μ の値は試料糸が摩擦される過程において漸次変化するものであるかも知れないが，これは相対的に変化するものと看做して無視し，摩擦前の試料糸の摩擦係数 μ をもつて，それら供試糸の摩擦係数とした。

一方において，μ と R との関係をみると第6図の如くである。即ちこの場合にも T_{200}/T_0 と μ との関係と同じく μ と R とは逆相関の関係にあることが知られる。

これを要するに，これらの供試糸についてみるとき，R の大なるもの程概して μ が小さく，μ の小なるもの程 $f_{(n)} = T_n/T_0$ が大であるという傾向をみとめることができる。

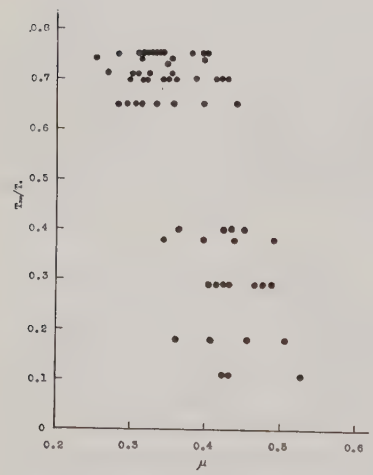


Fig. 5. Relation of coefficient of friction to the wear resistance of the teviron-twines. T_{200}/T_0 denotes wear resistances.

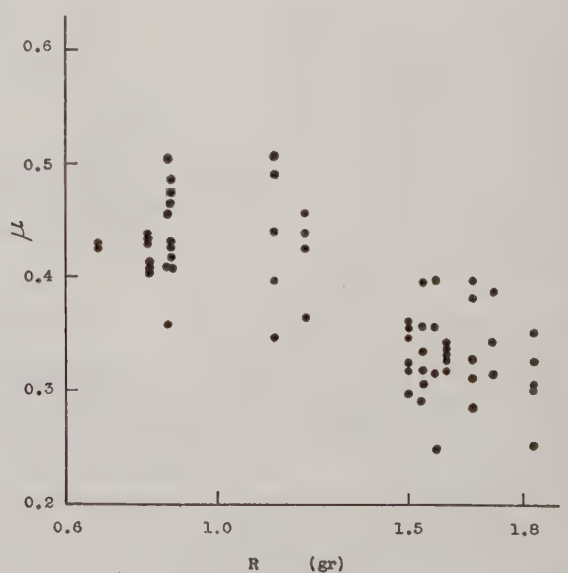


Fig. 6. Relation of rigidity to coefficient of friction of the teviron-twines.

III. 論　　議

本実験において，同種の原糸よりなる同一構成の漁網糸間の耐摩強度に非常に大きな差異のあることが指摘された。またこれを明らかにするために行われた別の実験において，これらの漁網糸間に種々性状の相違があり，摩擦係数の小なるもの程耐摩強度が大きく，そのようなものはまた剛軟度が大きいという傾向のあることが知られた。剛軟度及び摩擦係数は耐摩強度とそれぞれの相関及び逆の相関関係を有するが，耐摩強度に対し，この二者がそれぞれ独立に影響を及ぼすものであるか否かについては明らかでない。しかし摩擦係数と剛軟度との間には可成り高い逆相関がみられるので，この場合には剛軟度の相違によつて摩擦係数に差異を生じ，摩擦係数の小なるもの程耐摩強度が大きくなつたとの推定が妥当であるようにおもわれる。しかしこのような因果要因が耐摩強度の上にどの程度の支配力を有するかについては明らかでない。

更に剛軟度は本実験の場合，中撚によつて最も強く支配され，他の撚の影響は非常に小さいことが統計的手段により明らかにされた。下撚の平均撚数及びその分布巾は中撚の場合と同程度に大きいが，単糸の直径は strand の直径よりもずつと小さいためにその撚度及び撚度の分布巾は中撚のそれよりはるかに小さくなる筈であり，上撚数及びその分布巾は中撚のものに比し小さいので撚糸 (twine) の直径が大きい割にその撚度及び撚度の分布巾は中撚のそれより大きくないとみられる。つまり剛軟度の大いさを支配する要因が本実験の場合においては中撚であり，他の撚や，それらの交互作用が有意でないとみられるに至つた主たる原因は，中撚の撚度の大いさ及びその分布巾が他の撚のそれらに較べて大きかつたことにより，中撚が撚糸 (twine) の内圧の増大に最も強く影響し，これが直接に剛軟度の大小となつてあらわれたものとみられる。

このように考えるときは，漁網糸の耐摩強度は中撚そのものでなくても，撚糸 (twine) の内圧，したがつて剛軟度を大きくするような原因があれば，それが上撚や下撚であつても，増大するものと考えることができるかも知れない。

これを撚の機構の上から考えてみると，次のように推論される。即ち oil-stone の接触面で漁網糸が硬いのは strand の撚 N_2 の大なる場合である。上撚が中撚と釣合つて撚が戻らない程度になつているものとすれば上撚数 N_3 は中撚数 N_2 で決まる筈である。また fibre の撚は単糸の直径が非常に小さいのでその撚数 N_1 が甚しく大でない限り，撚糸 (twine) の内圧を高めるには至らないから，この実験の範囲では下撚の影響は極めて小さいであろう。したがつて撚の強さは中撚でもつて代表できる筈で，これより一般に中撚は上撚とともに（剛軟度の増大と摩擦係数の減少に関係して）T_n/T_0 の大いさに対して重大な影響力を有するものと考えられる。第7図は第1表の値より N_2 及び N_3 と T_{200}/T_0 との関係を図示したもので，図中添数字は N_3 である。この図は上述の考えのほぼ適合することを示すものであるが，幾つかの case において適合しないものがあるのは，供試糸の実際の上撚と中撚が必ずしも釣合つていないことを意味するものであり，2. において上撚及び中撚の交互作用の T_n/T_0 に及ぼす影響の余り強く現われていないのはこのためであろう。市販の漁網糸は一般に供試糸よりも遙かに小さい下撚数をもつものであるから，市販糸については下撚の影響はますます小さいと考えられる。但し本実験の供試糸は無熱処理のものであり，熱処理その他の方法により可塑的特性が特別に附与された糸についてはこの限りでない。

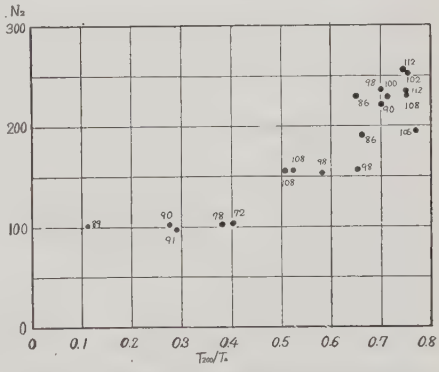


Fig. 7. Relation between T_{200}/T_0, and N_2 and N_3.
* Numerals placed at the plotted points indicate the values of N_3.

次に耐摩強度 $f_{(n)}$ の形からして，漁網糸の磨損はこれに働く仕事の外に被摩擦面の摩擦圧力の大いさに特別の影響を受けるように推察される。しかるに一方では剛軟度の大きいものは摩擦物体との接触面が小さ

く，単位面積当りの摩擦圧が大きい筈であるのに $f_{(n)} = T_n/T_0$ は概して大といえる。この間の定量的関係についての究明は今後に残される。また撚糸 (twine) の軸即ち摩擦方向とその繊維，単糸及び片撚糸等とのなす角の耐摩強度に及ぼす影響についての検討も今後に残される。

終りに臨み，この研究を指導していただいた本所宮本科長，テーマをいただいた高山部長並びに御稿閲賜わつた田内森三郎博士に厚くお礼申し上げる。また実験材料を提供された帝国人造絹糸株式会社に深謝する。

文　　献

1) 田内・安田：水産物理談話会報，**10**，(1930).
2) 近藤　仁：本誌，**5**，(6)，(1937).
3) 本多勝司：合成繊維漁網，産業資材調査会，(1949).
4) 土屋正三：本誌，**16**，(7)，(1950).
5) 下崎吉矩他：合成繊維漁網集録，水産研究会，(1951).
6) 宮本　高山：本誌，**21**，(3)，(1955).
7) 川合角也：水産講習所試験報告，**6**，(3)，(1910).
8) 田内森三郎：水産講習所研究報告，**25**，(2)．(1929).
9) 近藤　仁：本誌，**4**，(5)．(1936).
10) 藤田　博：本誌，**17**，(2)，(1951).
11) 石井・小泉：本誌，**20**，(2)，(1955).
12) 小泉　孝：本誌，**20**，(7)，(1955).
13) ————：本誌，**21**，(3)，(1956).
14) 三善清旭：本誌，**3**，(3)，(1935).

水産化学及び利用

MARINE PRODUCT UTILIZATION AND CHEMISTRY

魚介肉蛋白

Muscle Proteins of Aquatic Animals

青　　肉

Green Meat

ビタミン

Vitamins

食品保蔵・加工

Food Preservation and Processing

原子力利用

Peaceful Use of Atomic Energy

貝　　毒

Shellfish Poison

On the Nature of the Streaming Birefringence Observed in the Aqueous Extracts of Squid Muscle—II. Dissolution of "Myosins*)" in the Aqueous Extract

Masao MIGITA and Juichiro J. MATSUMOTO

(*Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*)

日本水産学会誌

第二十三巻 第十一号 別刷

昭和三十三年三月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of

the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 23, No. 11, March 1958

On the Nature of the Streaming Birefringence Observed in the Aqueous Extracts of Squid Muscle—II. Dissolution of "Myosins*" in the Aqueous Extract

Masao MIGITA and Juichiro J. MATSUMOTO

(*Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*)

In the previous paper[1] it was shown that when squid muscle is repeatedly extracted with 2~20 vol. of water, in the second and the following extracts streaming birefringence (SB) was observed and that on centrifugation the content of the tube separated into three layers, supernatant liquid layer (extract, A-phase in the previous paper), precipitates at the bottom (B-phase) and a translucent pasty layer (C-phase) between them (cf. Fig. 1). An upper part of C-phase was observed to form a fluid (D-phase) which flowed out on decantation.

As for the development of SB the authors proposed an assumption that the aqueous extracts of squid muscle might contain "myosins" which has been brought into dispersed state for some unknown reason. The assumption was based on the fact that in squid muscle the amount of proteins obtained by repeated extractions with water is much greater than that of "non-myosins", as well as on the solubility behaviors of proteins found in the aqueous extract toward KCl solutions of varied ionic strengths.

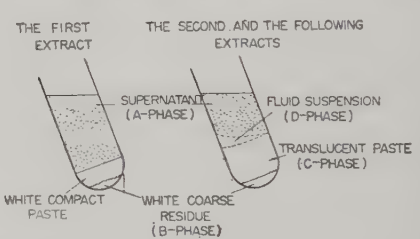


Fig. 1. Patterns of the contents of centrifuging tube after centrifugation of the aqueous extracts of squid muscle.

On the other hand properties of C-phase, especially i) development of strong SB when suspended in water, ii) tendency to pass gradually into suspension, and iii) decrease of the apparent volume of C-phase in the course of repeated extractions, seemed to suggest that proteins composing C-phase might be the origin of the streaming birefrigent proteins in the aqueous extracts.

In order to give some evidences to these assumptions, SB and solubility behaviors of "myosins" prepared from squid muscle, and of C-phase separated from the aqueous extraction residue were compared with those of aqueous extracts.

Received Sep. 14, 1957.
Contribution B No. 273, from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo.
Read before the Annual Meeting of the Chemical Society of Japan on April 3, 1954.

* The term "myosins" is used to denote the total muscle proteins which dissolve in salt solution and precipitate on dilution.

Experimental

Methods

A. Preparations

Aqueous extracts The first extract S_1 was obtained by extracting 10 g. of squid muscle with 50～200 m*l.* of water by a hand-made blendor[2] centrifuging it by 3,500～4,000 r.p.m. (1,100～2,800 *g*). From the residue in the first extraction was similarly obtained the second extract S_2.

S_1 did not generally possess SB, while S_2 always did.

"Myosins" Fresh squid muscle was treated with 1 M KCl containing 0.02 M $KHCO_3$, pH being adjusted to 7.2～7.3. After centrifugation the supernatant liquid was diluted to an ionic strength (*I*) 0.1 at pH 7, kept in the cold for 4～5 hours. "Myosins" precipitated as white translucent gel.

Separation of C-phase In the second extraction of squid muscle with water, the supernatant liquid S_2 was decanted out after centrifugation, and translucent pasty C-phase was spooned up.

B. Intensity of SB

Diluting sample solution serially twofold, the change of the pattern observed in the field of the crossed Nicol prisms was followed. The patterns were classified as follows :

+ ; a distinct cross appears,

± ; bright and dark areas are moving like a cluster of clouds, forming no distinct cross,

± ; the clouds are very faint,

— ; the field remains dark.

The intensity of SB of sample solution was represented as described in the previous paper by the minimum concentration which produces a definite pattern.

Results

(A) SB of S_2, Preparation "myosins" and salt extract

SB of S_2, Preparation "myosins" and KCl (1.0 M) extract obtained from the same squid muscle was compared where "myosins" was tested as a suspension in water (Table 1).

Table 1. Streaming birefringence of the aqueous extract S_2, aqueous suspension of Preparation "myosins" and KCl extract of squid muscle

Pattern of SB	Aqueous extract S_2	"Myosins" suspended in H_2O	KCl extract
+	0.5	0.29	1.30 (1.1)*
±	0.25	0.15	0.65 (0.56)
±	—	—	0.33 (0.28)

Figures in the table denote the minimal concentrations of sample (mg. proteins/m*l.*) to give the respective patterns when water is used as diluent.

* Figures in parentheses denote concentration of "myosins" in KCl extract.

From the table it may be said that the three samples were roughly in the following order with respect to the intensity of SB :

Preparation "myosins" $>$ S_2 $>$ salt extract.

There were however evidences suggesting that weaker SB of the KCl extract may be due to the effect of KCl. Thus SZENT-GYÖRGYI[3] has observed that his myosin exhibited SB when dispersed in water, but not when dissolved in 0.5 M KCl solution, and with SP of myosin, which is actomyosin in the present knowledge, EDSALL and MEHL[4] observed inhibitory effects of inorganic salts.

Table 2. Inhibitory effects of inorganic salts on SB of aqueous extract, suspension of "myosins" and KCl extract of squid muscle

Sample	The 2nd aqueous extract					"Myosins" suspended in H_2O					KCl extract				
Diluent		H_2O	KCl 1 M	LiCl 1 M	$MgCl_2$ $\frac{1}{3}$ M		H_2O	KCl 1 M	LiCl 1 M	$MgCl_2$ $\frac{1}{3}$ M		H_2O	KCl 1 M	LiCl 1 M	$MgCl_2$ $\frac{1}{3}$ M
Initial solution	mg. pr./ml. 0.99	+				mg. pr./ml. 4.68	+				mg. pr./ml. 4.47*		+		
Dilution															
× 2	**0.50**	+	−	−	−	2.34	+	+	+	+	2.24	+	+	+	−
× 4	0.25	±	−	−	−	1.17	+	+	±	±	**1.12**	±	+	+	+
× 8	0.12	−	−	−	−	0.58	+	±～±	−	−	0.56	−	±	±	±
×16						**0.29**	+	−	−	−	0.28		±	−	−
×32						0.14	±	−			0.14		−		
×64						0.07	−								

Samples are the same as those in Table 1.

* Denotes "myosins" in the extract.

In order to prove it directly, effects of inorganic salts on SB of the above three samples were examined by twofold serial dilution with KCl, LiCl and $MgCl_2$ solutions of ionic strength 1 (Table 2). In the case of S_2 and Preparation "myosins" decrease in SB was clearly observed at a higher protein concentration when diluted with salt solution than with water. On the other hand, in the KCl extract it was found that it did not lose SB down to a lower protein concentration when diluted with salt solution than with water. The latter fact may be due to insolubilization of "myosins" owing to the fall of KCl concentration when diluted with water. For example, at the second dilution with water KCl concentration became 0.25 M, which is the threshold value for precipitation of actomyosin.

Thus S_2 and "myosins" suspension behaved almost similarly in SB, but some

Table 3. Stability of SB against centrifugation of aqueous suspension of C- and D-phases

Pattern of SB	C-phase	D-phase	D-phase after centrifuged (4,000 r. p. m. 10 min.)	"Myosins" suspension
+	0.72 (0.66)*	0.36	0.86	0.29
±	0.36 (0.33)	0.18	0.42	0.15
±	0.09 (0.08)	0.09	0.13	—
SB after centrifuged	Remains	Remains	. . .	Disappears

* Figures in parentheses denote concentration of "myosins".

differences were observed between them. For example, the former persisted in showing SB after centrifugation of 4,000 r. p. m. for 30 min., while the latter was easily precipitated by centrifugation of 3,000 r. p. m. for 10 min. and SB was no longer detectable in the supernatant liquid.

(B) C-phase and D-phase

Translucent pasty C-phase and fluid D-phase were suspended in water respectively and their SB was examined by serially diluting with water (Table 3). They exhibited SB of strength and stability nearly equal to S_2. Most of the proteins remained in solution and SB diminished only little after centrifugation. If this suspension, however, was diluted with 0.2 M KCl, and centrifuged for 10 min. at 3,000 r. p. m., a bulk of proteins precipitated and the supernatant liquid became clear and exhibited no SB.

(C) Fractionation of C-phase

C-phase was dissolved in 0.6 M KCl, whereby only 1～16 % of proteins was left undissolved, and the solution was diluted to an ionic strength 0.04 at pH 6.6. After standing overnight in the cold, the solution was centrifuged and the precipitates were estimated. They amounted to 92 % of the total dissolved proteins in C-phase and proved to be strongly streaming birefringent. These proteins are considered to correspond to myosin and actomyosin in the case of rabbit muscle.

(D) Solubility of proteins of C-phase in KCl solution

KCl solutions of varied concentrations were added to C-phase, left overnight in the cold, and proteins in the supernatant liquid (pH 5.9～6.4) were determined (Fig. 2). The solubility curve is quite similar to that of rabbit myosin of SZENT-GYÖRYI[5]. It was also observed that at ionic strengths below the point of the minimal solubility the turbidity of the solution was stronger and the precipitates swoll. In these respects the proteins in C-phase have a strong resemblance to streaming birefringent proteins in the aqueous extract.

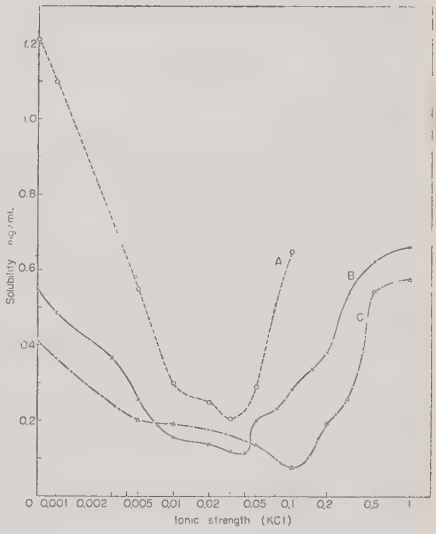


Fig. 2. Solubility of proteins of traslucent paste (C-phase) in KCl solutions of varied ionic strengths.
A, B: C-phase,
C : Mixture of the third and the fourth extracts.

Discussion

Differences between the first and the second aqueous extracts

There are observed distinct differences between S_1 and S_2 in SB of supernatant liquid as well as in the state of precipitates (Fig. 1). These differences seem to be explained by a significant difference observed in their ash contents (Table 4). Taking the ash in the supernatant liquid as NaCl, ionic strengths of S_1 and S_2 were found to be 0.019 and 0.006 respectively. According to the previous paper and Fig. 2 in this paper, streaming birefring

Table 4. Differences between the first and the second extractions

Extraction	Supernatant		Precipitate
	SB	Ash(%)	
1st	−	0.12	Soft but rather compact
2nd	+	0.04	Composed of, beside compact residue, translucent and swollen C-phase

ent proteins in S_2 as well as in C-phase had the minimal solubility at ionic strength near 0 02 ~0.1. Thus S_1 can contain only little streaming birefrigent proteins while in the second and the following extracts such proteins are dispersed in water, since the ionic strength lies in the lower side of the point of the minimal solubility. This may explain not only the developement of SB but also the observed difference in the appearance of precipitates in the latter extracts.

Similarity and difference between Preparation "myosins" and the proteins in S_2 and C-phase

Aqueous suspension of Preparation "myosins", the second aqueous extract, and C-phase dispersed in water showed close similarity in SB and solubility behaviors. In addition from analytical point of view, a major constituent of the streaming birefringent extract[1] and of C-phase appears to be composed of the fnaction of "myosins". These facts may suggest the identity of these proteins with Preparation "myosins". Nevertheless some differences were found among their solubility behaviors.

Firstly, proteins in C-phase exhibited the minimal solubility at $I=0.03\sim0.04$, while those of S_2 at 0.1 as reported in the previous paper. Probably this difference is due to the variation in actin content of the fraction separated as "myosins", owing to extraction conditions and history of material etc. And the difference in actin co tent affects in turn the solubility of fraction "myosins", because it has been shown by SARKAR[5] that both myosin and actomyosin have at $I=0.05$ the point of precipitation maximum, but the latter precipitates in a wider zone of salt concentration.

Secondly, Preparation "myosins" was apt to be readily precipitable by centrifugaton, while the others were stable against centrifugation of 4,000 r. p. m. 30 min. The latters however became also easily precipitable in the presence of a minute amount of salt. These three samples have been prepared from one and the same muscle, but there is an important difference in the procedure of their preparation, that is, Preparation "myosins" has been extracted with KCl solution, while the other two have been prepared without contacting with KCl at all. That salt exerts a significant influence on myosins has been shown in the observationof PERRY[6] that the effect of cations on the ATPase activity of intact myofibrils is quite different from that of the same myofibrils under otherwise identical conditions except that they have initially been dissolved in salt solution. This as well as the fact that the stability of aqueous suspension of C-phase was lost on addition of a small amount of salt may suggest that the streaming birefringent proteins in the aqueous extract and C-phase are essentially identical with "myosins", but the latter has undergone a sort of change because of contact with KCl in the process of preparaton.

C- and D-phases may be considered as intermediate states observed when "myosins" dissolve into water.

Summary

A translucent paste (C-phase) obtained from the residue in extraction of squid muscle with water showed a close resemblance in SB and solubility behaviors with streaming birefringent proteins in aqueous extract and Preparation "myosins".

More than 90% of the total dissolved proteins of C-phase were estimated as "myosins" at pH 6.6, and were readily dispersed in water to show strong SB.

Streaming birefringent proteins in aqueous extract and in C-phase showed a stronger stability against centrifugation than "myosins" when dispersed in water. The difference may be considered to be due to an effect of KCl, because the former two have been prepared without contacting with KCl, while "myosins" has been prepared from KCl extract of muscle, and because the stability of the aqueous dispersion of C-phase is lost in the presence of a small amount of KCl.

Proteins of C-phase might be considered to be intact squid "myosins" and the origin of SB observed in aqueous extract of squid muscle.

The authors are indebted to Mrs. Tomiko SAISHU for her technical assistance.

References

1) MIGITA, M. and MATSUMOTO, J. J. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 641～52 (1954).
2) MATSUMOTO, J. J. : *J. Jap. Chem.*, **9**, 202～3 (1955).
3) SZENT-GYÖRGYI, A. : "Chemistry of Muscular Contraction", Academic Press, New York (1947).
4) EDSALL, J. T. and MEHL, J. W. : *J. Biol. Chem.*, **133**, 409～429 (1940).
5) SARKAR, N. K. : *Enzymol.*, **14**, 237～45 (1950).
6) PERRY, S. V. : *Biochem. J.*, **48**, 257～65 (1951).

On Purified M-Actomyosin of Squid Muscle

Juichiro J. MATSUMOTO
(*Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*)

In the previous work[1], it was reported that response of streaming birefringence (SB) of M-actomyosin, an actomyosin-like protein of squid muscle, responds to the addition of adenosinetriphosphate (ATP) and that the adenosinetriphosphatase (ATPase) activity of M-actomyosin which functioned during the ATP-response appeared not to be inhibited by the presence of Mg ion. Though the effect of bivalent metallic ions such as Ca and Mg ions on ATPase activity is very complicated, a greater number of the investigators share an opinion that there are two kinds of muscle ATPase, a water-soluble, Mg-activated ATPase as well as another ATPase inherent to myosin, which is activated by Ca but inactivated by Mg[2)3)4)5)]. Hence the ATPase activity of M-actomyosin seems distinct from that of myosin and actomyosin of rabbit regarding to the effect of Mg ion. However, as the preparation of M-actomyosin studied previously might have been contaminated with the former of these ATPases, further study is needed with a preparation freed from the water-soluble ATPase.

The present paper includes the responses of SB and viscosity to the addition of ATP as well as the phenomenon of superprecipitation with special interest to the effect of Mg ion, using a preparation presumably freed from the water-soluble ATPase by repeated precipitations.

Experimental

METHODS

Unless otherwise stated, methods employed were the same as the previous paper[1].

Preparation : In the previous work, M-actomyosin was precipitated from the aqueous extracts obtained by a number of repeated extraction. It was found later that use of a larger amount of water, 20～30 times the weight of muscle (v./w.), in the third extraction was more convenient, allowing the extraction of a good amount of the streaming birefringent proteins so that further repetition of extraction was dispensable. Moreover, while in the previous paper, by analogy of the salting-in range of rabbit actomyosin, M-actomyosin precipitate was collected by dialysing overnight the aqueous extract against 0.3 M KCl, it was also found later that this protein precipitated only by addition of KCl to 0.05～0.1 M. So in this time the precipitate was collected first at 0.05 M KCl and reprecipitated at 0.3 M KCl at which the dialysis in the previous work was done. The whole course of

Recevied Oct. 5, 1957.
Contribution B No 275, from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo.

the preparation was as follows :

A very fresh squid, *Ommastrephes sloani pacificus* STEENSTRUP, purchased in whole sale market was skinned and its mantle muscle was minced. To 40 g. of the mince, 280 m*l*. of redistilled water was added, extracted for 10 min. by aid of a glass-stirrer, and centrifuged. The residue was reextracted with 240 m*l*. of water and further with 800 m*l*. as before. From the second and the third extracts which were both streaming birefringent, the latter, showing a very intense SB, was taken and recrystallized KCl added was so that a concentration of 0.05 M. was attained. The mixture which was taken 1 hour after adding KCl was centrifuged for 30 min. at 4,000 r.p.m. (1,500~2,800 *g*). The sediment was dissolved into 0.6 M KCl solution, precipitated twice by diluting it to 0.3 M KCl, and the protein was made up to a solution at 0.5 M or 0.6 M KCl (pH 6.4~6.6), insoluble matter being removed by centrifugation after a night cold storage. The sample thus prepared was viscous and highly opalescent, showing an intense SB. Protein concentration was 2.1 ~2.6 mg./m*l*. and yield, 1.6~2.3 % of total muscle proteins.

Streaming birefringence (SB) : The apparatus shown by OKADA and TADA[6] was used. In a series of repeating twofold dilutions of the sample solution with 0.6 M KCl, the lowest protein concentration for showing + pattern of SB was determined and response to added ATP was studied using the protein solution of this concentration. To 10 m*l*. of the protein solution, 0.2 m*l*. of 0.25 M $MgCl_2$ or water, and 1 m*l*. of 0.020 M ATP were added and SB was pursued.

The final concentration of Mg ion in the above mixtures and also the final concentrations of Mg and Ca ions in the mixtures for the viscosity experiment, were adjusted to 0.001 M, where the Mg ion is said to show an inhibitory effect while the Ca ion an activating one to the ATPase of myosin and actomyosin of rabbit in the presence of 0.5~0.6 M KCl.[2)3)7)].

Viscosity : Two OSTWALD viscometers (capillary diameter, 0.7 mm.; capillary length, 93 mm. and 95 mm.; volume of the bulb, 1.92 cc. and 2.06 cc.; time of outflow for 0.5 M KCl at 25°C., 12.0 sec. and 13.7 sec.) were used. To 5 m*l*. of the protein solution, 0.1 m*l*. of water, 0.02 M $MgCl_2$ or 0.02 M $CaCl_2$ were added, and then after the viscometer was placed in a thermostat at 25°C. for 5~10 min., 0.5 m*l*. of 0.028 M ATP solution was added and the change of viscosity was examined.

Superprecipitation : One volume of the protein solution in 0.5 M KCl, was diluted with 3 volumes of water and 1 volume of veronal acetate buffer (I=0.1, pH 6.3), and the protein was brought to a suspended state in a medium of 0.12 ionic strength. To 1 m*l*. of this suspension 0.02 m*l*. of water, M/20 $MgCl_2$, or M/20 $CaCl_2$, and 0.1 m*l*. of 0.028 M ATP solution were added and the change that followed was examined.

ATP sample : ATP-Na_4 of zellstofffabrik was dissolved and used immediately. The purity estimated from Δ7P was 80 %.

RESULTS

(*A*) *Response of SB to ATP* (Fig. 1)

The solution of M-actomyosin itself showed SB at the concentration used in the ex-

periment. If ATP was added to the solution at room temperature, SB disappeared instantly, restored (recovered) to an extent within 5 min., and SB as intense as that before adding ATP was observed 7 min. after the addition of ATP (Curve B). This consequence was almost the same as that of the previous study. When $MgCl_2$ was added, there was found a delay in the restoration of SB, and as late as 20 min. after adding ATP, SB was judged as + pattern, whereas this + pattern was rather inferior in intensity to the + pattern observed before the addition of ATP. SB, however, could not be observed when it was examined 50 min. after the addition of ATP (Curve C).

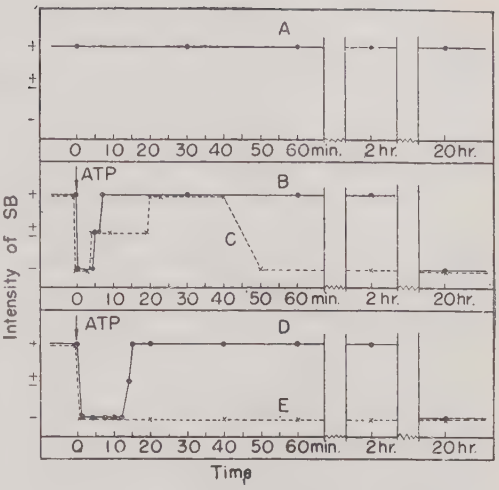


Fig. 1. Changes of SB of purified M-actomyosin in 0.6 M KCl upon addition of ATP.

	A	B	C	D	E
Protein concn, mg./ml.	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
ATP ($\times 10^{-3}$ M)	—	1.8	1.8	1.8	1.8
$MgCl_2$ ($\times 10^{-3}$M)	—	—	1	—	1
pH	6.4	6.4	6.4	6.5	6.5
Temperature, °C.	17	17	17	~0	~0

In another experiment, wherein the sample solution was kept in contact with ice and occasionally taken out for examination of SB, it took about 15 min. before SB restored (Curve D). In the presence of Mg ion and at a low temperature as well the once-disappeared SB was never found again, even over the following 2 hours (Curve E). When examined after a night, all samples ever subjected to ATP addition showed no SB (Curves B~E), while SB was invariably found in the sample that was never added with ATP (Curve A).

These results suggest that the sample studied here also undergoes the dissociation as shown in Equation (1) which was referred to in the previous paper.

$$\text{actomyosin} \xrightarrow{+\text{ATP}} \text{actin} + \text{myosin} \qquad (1)$$

In addition, the present data might suggest that the ATPase activity of M-actomyosin is depressed at low temperature and also in the presence of Mg ion, and thus the recombination of M-actomyosin as a result of enzymatic decomposition of ATP is inhibited by the same factors. The amount of the ATP added here was 150 g. mole per 10^5 g. protein.

(B) Response of viscosity to ATP (Fig. 2)

To trace the dissociation of actomyosin with ATP, the response of viscosity had been used more often by investigators, because the latter method is more suited to deal with the data quantitatively. So, in order to confirm the result of SB-response, the response of the protein viscosity to the ATP in 0.5 M KCl* alone, as well as in the presence of $MgCl_2$ or $CaCl_2$ were examined using another lot of preparation.

* In the experiment on SB-response above, KCl concentration was 0.6 M with the intention of checking up the previous work. In the experiment on viscosity, however, the salt concentration was reduced to 0.5 M because it was suggested by later observations that M-actomyosin is rather stable at lower ionic strengths.

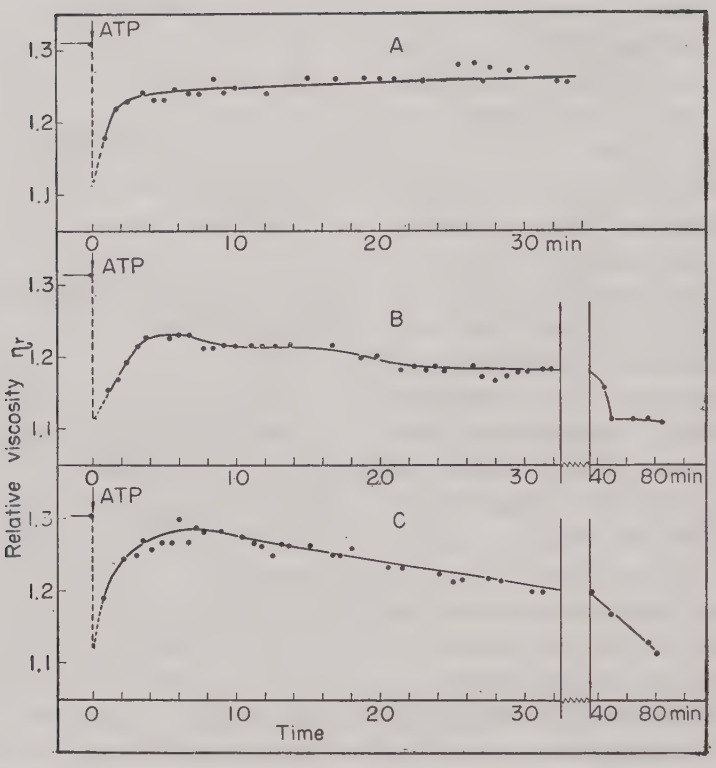


Fig. 2. Changes of viscosity of purified M-actomyosin in 0.5 M KCl upon addition of ATP.

	A	B	C
Protein concn. mg./ml.	2.0	2.0	2.0
ATP ($\times 10^{-3}$ M)	2.5	2.5	2.5
$MgCl_2$ ($\times 10^{-3}$ M)	—	1	—
$CaCl_2$ ($\times 10^{-3}$ M)	—	—	1
pH	6.5	6.4	6.3

The amount of ATP added here was 125 g. mole per 10^5 g. protein.

The results of Fig.2 suggest that the preparation of M-actomyosin studied here responds to ATP according to Equation (1), and then changes to reverse direction of Equation (1), as a result of decomposition of ATP. In these cases, not only the viscosity fall on addition of ATP was so quick, but the recovery of the viscosity was so rapid, that it was difficult to trace the initial change with the present viscometer. For these initial stages of the curves, extrapolation was made as shown by dotted lines along these curves. The values for relative viscosity at difinite points on the curves are shown in Table 1.

In Curve A of Fig. 2 where neither Mg ion nor Ca ion was present, the quickly restoring viscosity approached to its maximum value within 2 min. after adding ATP, and kept up a slow but steady increase until 30 min. after, when the observation was stopped. In the presence of Mg ion, next to a less quick increase within 5 min., the viscosity tended again to decrease (Curve B). The maximum value (η_1) which was attained by the recovery was by far lower compared with the initial viscosity (η). Also in the presence of Ca ion (Curve C), the restoration of the earlier stages was very quick and the

Table 1. Changes in relative viscosity of purified M-actomyosin in 0.5 M KCl upon addition of ATP

(Calculated from Fig. 2)

Sign of curve in Fig. 2		A	B	C	Note
Protein concn. mg./m*l*. Added cation		2.0 None	2.0 Mg^{++} 1×10^{-3} M	2.0 Ca^{++} 1×10^{-3} M	
Relative viscosity	Before adding ATP, (η)	1.31	1.31	1.30	
	Immediately after adding ATP (η_{ATP})	1.11	1.11	1.12	Extrapolated value
	Maximal value after recovery (η_1)	1.26	1.23	1.29	A, after 25 min. B, after 5 min.
	On prolonged standing (η_2)	1.26	1.11	1.12	C, after 5 min.
ATP-sensitivity, $\frac{ln\eta - ln\eta_{ATP}}{ln\eta_{ATP}}\times100$		159	159	132	

maximum value of the viscosity (η_1) was close to that before adding ATP, but after 10 min., the once-restored viscosity resumed to fall, and reached a value which is close to that of the final stage of the case with Mg ion.

A control experiment where 1.0 m*l*. of water instead of ATP solution was added, to the protein solution showed only a slight drop of viscosity, confirming the effect of ATP in the above experiments.

As a measure of the effect of ATP on viscosity, "ATPsensitivity",

$$\frac{ln\eta - ln\eta_{ATP}}{ln\eta_{ATP}}\times100$$

(η and η_{ATP}, relative viscosities before and after adding ATP)[8], is shown in Table 1. The ATP-sensitivity of M-actomyosin of squid under experimental condition was 132～159 %. These values are of a comparable order with those of actomyosins of rabbit (60～180 %)[8] and carp (116 %)[9].

(C) Superprecipitation

If ATP was added to the opalescent suspension of an M-actomyosin preparation at $I=0.12$, instantly the suspension became more transparent, and fine particulate aggregations were formed which deposited within 2 hours into a compact precipitate separating a clear mother liquid. Such a phenomenon was always found whether in the absence or presence of alkali earth metals. So it might be proved that this preparation shows a kind of superprecipitation. In these experiments the final concentrations of the components and other factors were as follows : Protein, 0.53 mg./m*l*. ; ATP, 1.8×10^{-3} M ; $MgCl_2$ and $CaCl_2$, 1×10^{-3} M ; *I*, 0.12 ; pH, 6.3～6.4 ; temperature, 17 °C. ; ATP/protein, 340 g. mole/10^5 g.

Discussion

The observed changes in SB and viscosity brought by added ATP stand in harmony with each other in supporting that dissociation of the protein molecule occurred like Equ-

ation (1), though it is obscure whether the said actin and myosin are strictly identical with actin and myosin of rabbit or carp.

The results obtained suggest that ATPase activity of M-actomyosin was prevented not only by the Mg ion of the studied concentration (1×10^{-3} M), but at low temperature. The effect of Ca ion appeared to be activating though the data obtained was not so precise.

There is another interesting point as regards the effect of Mg and Ca ions. Namely, if Mg or Ca ion was present, the once-restored SB and viscosity resumed to decrease. Also in the absence of Mg and Ca ions, if ATP was once added, the once-restored SB has disappeared a night after, while SB of the control sample to which ATP was not added was always detected even after a night standing. In other words, if M-actomyosin was brought to contact with ATP and a sort of dissociation was induced once, the protein has become less stable and might have been imposed with a tendency to reduce its asymmetry. Though the mechanism of these changes is obscure, the following appears to account in a general meaning for the consequences. If M-actomyosin is once brought into contact with ATP, and is once dissociated into its components, possibly into actin and myosin, the latters are less asymmetric in shape and more random in orientation than M-actomyosin. Thus, even when M-actomyosin might be formed again, it might not be able to restore fully the highly asymmetric and stable configuration as it was before. Besides these causes, some necessary factors for the stability of M-actomyosin might be lost in the recombination product.

In Table 1, values of η_2 of Curves B and C were close to those of η_{ATP}. This fact might suggest that there is some resemblance in molecular state of the protein between the stage where viscosity has fallen again and the stage immediately after the ATP addition. Thus, when viscosity has fallen again, M-actomyosin might also have dissociated into its components.

However, YOKOYAMA *et al.*[10] have reported a strange manner of viscosity change of myosin B fractions of scallop and other shellfishes, and YAGI *et al*[11]. has shown some confronting results with similar materials. At any rate, it could be suggested that, also in the case of squid muscle proteins, the mechanism of ATP-responses are by no means simple, as the cases with other mollusks' muscles.

Though data on the effect of Ca and Mg ions on ATPase of myosin and actomyosin of rabbit seem complicated, some investigators agree in that it is activated with 0.0001～0.01 M Ca ion and inhibited with 0.00001～0.01 M Mg ion, both at the higher ionic strengths (*e.g.* 0.5 M KCl)[2)3)7)].

As seen from the present data, the ATPase of M-actomyosin of squid is also prevented by Mg ion ; so, the possibility that it might be activated by Mg ion has now been eliminated. Hence, the activation by Mg ion observed in the previous study might have possibly been due to a contamination with a kind of Mg-activated ATPase[3)4)5)]. Further detailed study on ATPase activity will be treated in other report.

The ATPase activity of M-actomyosin has been found not to be of a new type as far as the effect of Mg ion is concerned, but the property that it is extracted easily with water from the muscle remains as a distinctive feature.

Summary

1) On M-actomyosin preparation of squid muscle purified by reprecipitations, its responses of streaming birefringence (SB) and of viscosity to adenosinetriphosphate (ATP) added were studied togather with superprecipitation.

2) The changes of SB stood in harmony with those of viscosity, suggesting that dissociation and recombination of M-actomyosin occurred successively when ATP was added. Superprecipitation was also confirmatively found with M-actomyosin.

3) In the process of ATP-responses of SB and viscosity, the adenosinetriphosphatase (ATPase) activity of M-actomyosin was found to be inhibited by Mg ion. It was shown that, as far as the effect of alkali earth metals on ATPase activity is concerned, M-actomyosin of squid is not distinct from actomyosin of rabbit and carp.

The author wishes to express his appreciation to Dr. M. MIGITA for his valuable advice, to Prof. S. MIZUSHIMA for his encouragement and to Miss. M. AKIBA for the technical assistance.

References

1) MATUMOTO, J. J. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **23**, 92～104 (1957).

2) ENGELHARDT, V. A. : "Advances in Enzymology", **6**, 147～91 (1947).

3) BAILEY, K. : "The Proteins", Vol. II, Part B, . 951～1055, (1954).

4) MOMMAERTS, W. F. H. M. : "Muscular Contraction" Interscience Publisher, New York (1950) 96.

5) KIELEY, W. W. and MEYERHOF, O. : *J. Biol. Chem.*, **176**, 591～601 (1948).

6) OKADA, M. and TADA, S. : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 224～31 (1954).

7) WATANABE, S., TONOMURA, Y. and SHIOKAWA, H. : *J. Biochem.* (*Jap.*), **40**, 387～402 (1953)

8) WEBER, H. H. and PORTZEHL, H. : "Advances in Protein Chemistry", **7**, 211, 215, 236 (1952) : PORTZEHL, H., SCHRAMM, G. and WEBER, H. H. : *Z. Naturforsch.*, **5b**, 61～74 (1950).

9) HAMOIR, G. : "Contribution a l'étude des proteines musculaires de poissones", Imprimerie H. Vaillent Carmanne. S. A., Liege (1955) 93 : "Advances in Protein Chemistry", **10**, 258 (1955).

10) YOKOYAMA, M., TERAYAMA, Y. and NAGAI, T. : *Kagaku*, **22**, 473 (1952).

11) YAGI, K., SASAKI, A. and MATSUMIYA, H, : *J. Jap. Biochem. Soc.*, **26**, 630～3 (1954).

Some Notes on M-Actomyosin of Squid Muscle*

Juichiro J. Matsumoto
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

In the previous reports[1)2)], a water-soluble fibrous protein which shows ATP responses like rabbit actomyosin was found in squid muscle, and this protein was called M-actomyosin by the present author. However, as far as the salting-in curves** of the preparations of this protein are concerned, it appears to be composed of two or more distinctive components (Fig. 1). Thus, these components were called Components I, II and III in order of decreasing ionic strength (I) of salting-in. Which of these components would be the said M-actomyosin? This needed experimental studies, and separation and purification of the component were necessary before the qualification from various aspects were done. The present report includes such studies and also the description of some properties of M-actomyosin, *e. g.*, its instability.

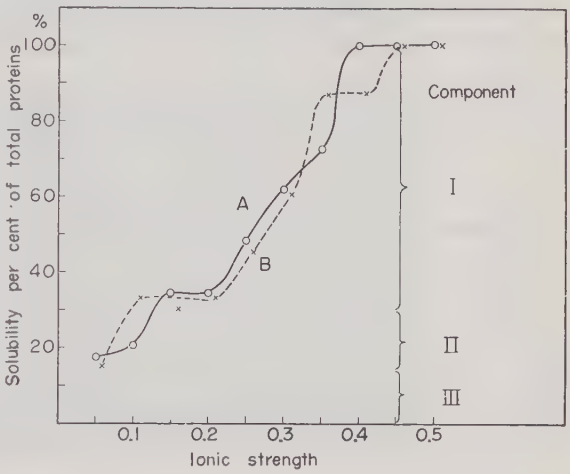


Fig. 1. Salting-in curves at pH~6.8 of M-actomyosin. Corresponding to Curves B and C in Fig. 7 of the previous paper[2)]. Unit of the ordinate is differently used in the present paper. Protein concentration in the mixture: Curve A, 0.23 mg./ml.; Curve B, 0.34 mg./ml.

Experimental

Methods

Most methods used here were the same as the previous works.[1),2)]

Paper-electrophoresis: Kobayashi paper-electrophoretic apparatus of Natsume Co. was employed. To keep the muscle globulins in solution, a phosphate-KCl buffer, $I = 0.5$ (phosphate, 0.15 + KCl, 0.35; pH 7.6), was used. Filter paper No. 50 of Toyo Roshi Co., 12.5 cm. × 15 cm. broad in horizontal part; Electric current, 1 mA/cm. width;

Received Dec. 2, 1957.

* Contribution B No. 276 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo.

** This method is very similar to that of Hasselbach *et al.*[3)], though the present method was designed independently to it.

16~18°C.; Duration, 15~21.5 hours. After the run the filter paper was air-heated, stained with 0.05% bromophenolblue containing 1% $HgCl_2$ and 2% acetic acid, being treated with liquid paraffin and NH_3 vapour. Then the optical density at 570 mμ of the boundaries was measured directly by an electorophotometer. A protein solution, 2.9 mg./m*l*., in 0.5 M KCl was applied in a density, 0.007 m*l*./cm. width (0.02 mg. proteins/cm. width). On every run, a solution of dried normal human serum (10 mg./m*l*.) applied to the same filter paper in 0.07 mg./cm. width was tested simultaneously, so that the peak of blood serum albumin is recorded as a standard of mobility.

Salting-in curve: The same method was used as that in the previous report[2]. While, in most cases, only a negligibly small amount of the protein was left undissolved at $I = 0.5$, in a few cases, the amount of undissolved protein was considerably large at this ionic strength (Figs. 4 and 7).

Results

(A) Which Component is the actomyosin-like protein?

Which of the components shown in Fig. 1 could be M-actomyosin involving the ATP-response of streaming birefringence (SB) and superprecipitation[2]. For studying this, a preparation was adopted which gave such a salting-in curve as Curve A of Fig. 2 and thus might contain three components in almost equal proportions. Such a preparation was obtained as precipitate by adding KCl to the streaming birefringent aqueous extract of squid muscle and bringing it to 0.05 M of KCl concentration (pH~7) in place of dialysing it against 0.3 M KCl.

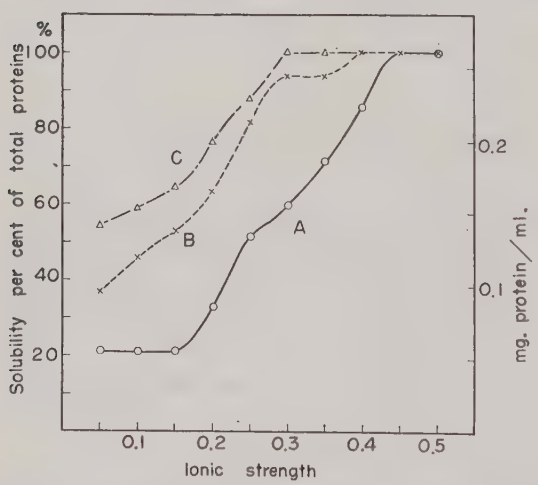


Fig. 2. Changes of the salting-in curves at pH ~6.8 of an M-actomyosin containing solution during cold storage.
Curve A, 5 hr. after preparation;
Curve B, 3 days " " ;
Curve C, 9 days " " .

Shortly after preparation, the solution (pH~7) was viscous and intensely streaming birefrigent, and showed superprecipitation as Picture I of Fig. 3 when adenosinetriphosphate (ATP) was added to its diluted solution ($I = 0.11$). If the preparation was kept dissolved at an ice-box temperature, its superprecipitation became less marked day after day (Fig. 3). In parallel to these changes, viscosity as well as the intensity of SB of this solution appeared also to decrease.

On the other hand, the salting-in curve of this solution (Curve A of Fig. 2) changed during cold storage into Curves B and C of Fig. 2. The change of the salting-

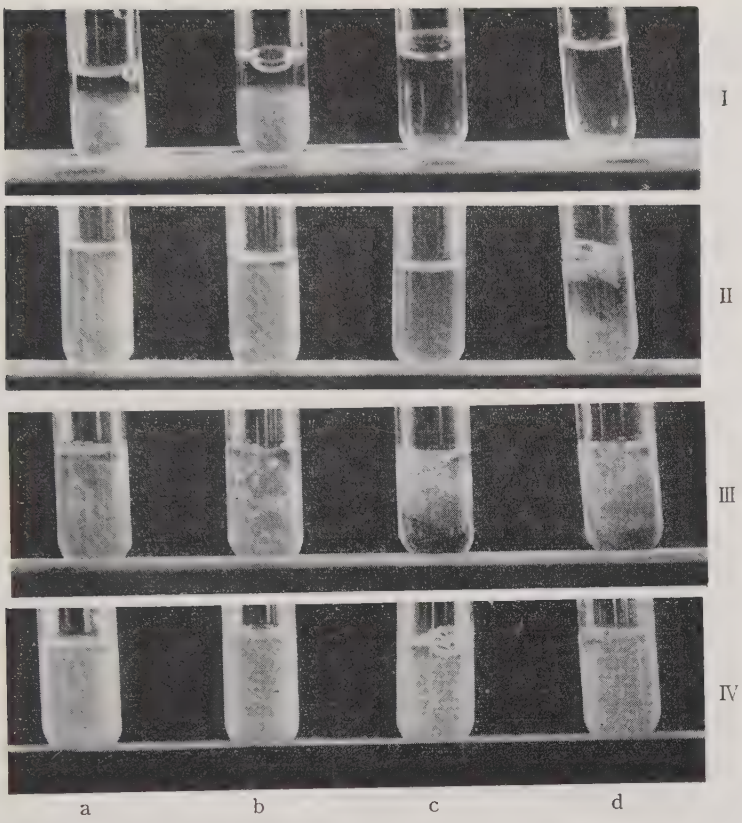


Fig. 3. Change of activity of superprecipitation of M-actomyosin during the storage of 0.5 M KCl solution.

Picture I, 6 hr. after preparation;
〃 II, 1 day 〃 〃 ;
〃 III, 2 days 〃 〃 ;
〃 IV, 3 days 〃 〃 .
Tube a, control;
〃 b, control with $MgCl_2$ added;
〃 c, with ATP added;
〃 d, with ATP and $MgCl_2$ added.
For each tube: Protein concentration, 0.22 mg./ml.;
KCl, 0.1 M; ATP, 7.0×10^{-4} M;
$MgCl_2$, 0.001 M.
Each picture was taken after equilibrium had been achieved.

in curve suggested that Component I decreased while Components II and III increased in the solution. Thus, Component I might be related to superprecipitation, the intense SB, and the high viscosity, and might correspond to M-actomyosin. In addition, this view would be supported by the results of the previous work[4] that superprecipitation and responses of SB and viscosity to added ATP were found with a preparation which was possibly freed from the component, soluble at lower ionic strengths by reprecipitating at 0.3 M.

(B) Some trials in purifying M-actomyosin

Efforts were made to isolate M-actomyosin or Component I. Thus as a general principle, KCl was added to the aqueous extract, the precipitating protein was collected and dissolved into 0.6 M KCl solution and then subjected once or a few times to reprecipitation by diluting it with water. The effect of the experimental conditions on the homogeneity of the resulting preparation was studied by using the salting-in curve (at pH~6.8) as the criterion.

In a series of experiments the following was observed:

i) To precipitate M-actomyosin from an aqueous extract, the addition of KCl up to 0.05~0.3 M sufficed in place of dialysing against KCl solution as used in the previous works. The preparation obtained by this procedure contained less amount of Components II and III and also the yield there of Component I was rather better compared with the case of dialysis.

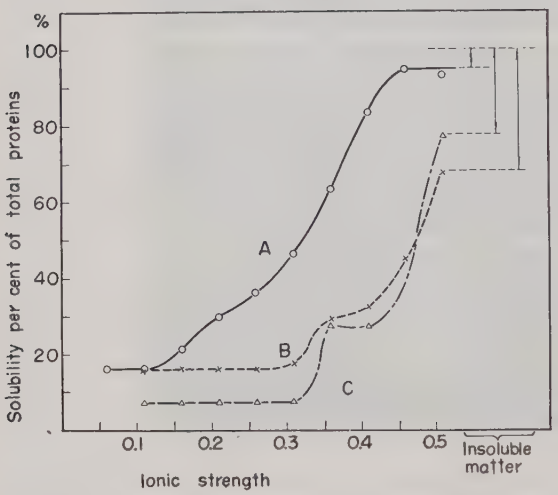


Fig. 4. Change of the salting-in curves of M-actomyosin preparation with reprecipitation.
Curve A: Solution A, precipitated from aqueous extract at $I = 0.25$ and stored overnight at $I = 0.6$;
Curve B: Solution B, obtained by reprecipitating Solution A at $I = 0.25$;
Curve C: Solution C, obtained by reprecipitating Solution B at $I = 0.25$.
Protein concentration in the mixture:
Curve A, 0.31 mg./ml.; Curve B, 0.17 mg./ml.; Curve C, 0.12 mg./ml.

ii) Each reprecipitation at 0.2~0.3 M improved the homogeneity of the preparation to a certain extent, but the preparations which were obtained even by three times reprecipitations were not quite free of Component II, as far as the salting-in curve at pH~6.8 is concerned (Fig. 4). On the other hand, if the reprecipitations were done at an ionic strength higher than 0.25, Component I was changed so as it was dissolved again only in higher ionic strengths, and, a part of it became often insoluble even in an ionic strength as high as 0.5. Namely, repetition of precipitation appeared to make Component I less soluble (Fig. 4).

iii) The effect of concentration of KCl which was used to selectively precipitate or reprecipitate Component I was examined (Fig. 5). If made at 0.1 M KCl, an inflexion point was apparent in the salting-in curve as Curve A of Fig. 5 which suggests the presence of Components II and III. Repeated precipitations at 0.3 M KCl gave a preparation as Curve B, but this process appeared to induce insolubilization of the protein as described above. Curve C was obtained from a preparation which was reprecipitated three times at 0.2 M KCl. This preparation, together with some obtained by the same method, appeared most homogeneous one among many preparations studied, though few

cases obtained by the same procedure did not gave salting-in curves suggesting a high homogeneity.

In addition, it would be interesting that a few preparations which were obtained by precipitating once only at 0.2 M KCl from the aqueous extract showed salting-in curves similar to Curve C.

(C) Change of M-actomyosin during storage

If a preparation mainly composed of Component I was stored in a cold place as a solution in 0.5～0.6 M KCl (pH～6.5), some change as Fig. 2, was always found in the salting-in curve of the preparation. Thus, it was suggested that Component I was changed into other states. The rate of the change varied from preparation to preparation. For example, a preparation did not show within 2 days any appreciable change in salting-in curve, while another preparation showed a change after a night, though it did not within 6 hours. The reason for the variation in stability was not clear.

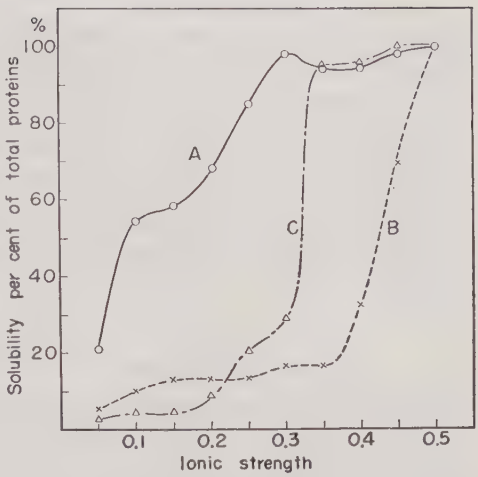


Fig. 5. Salting-in curves at pH～6.8 of some preparations of M-actomyosin.
Curve A, Precipitated once at $I = 0.1$ from aqueous extract;
Curve B, Precipitated once at $I = 0.05$ and reprecipitated 3 times at $I = 0.3$;
Curve C, Precipitated 3 times at $I = 0.2$.
Protein concentration in the mixture:
Curve A, 0.5 mg./ml.; Curve B, 0.29 mg./ml.;
Curve C, 0.40 mg./ml.

The change of Component I was not prevented, when the preparation was stored in cold at 0.2～0.25 M where the protein was in a precipitated state. So, it appeared that the study of M-actomyosin as its intact state must be made immediately after the preparation.

In order to prove that the above change of the protein has actually occurred during storage, paper-electrophoresis was carried out with an M-actomyosin preparation (Fig. 6). When tested immediately

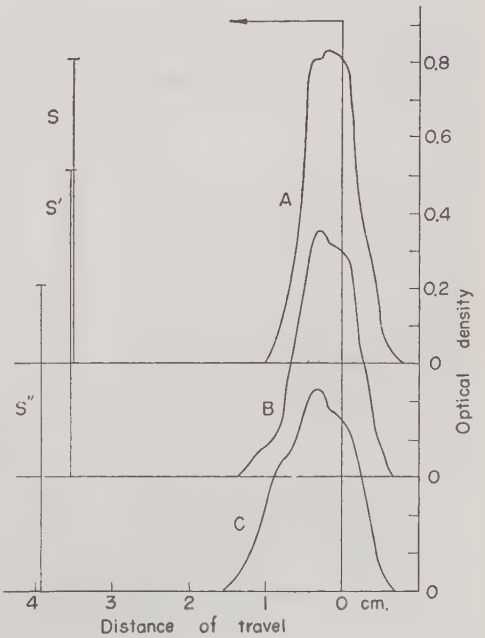


Fig. 6. Paper-electrophoresis of a M-actomyosin containing solution.
A, Immediately after preparation;
B, 2 days after preparation;
C, 8 days after preparation.
S, S', S'': Serum albumin which ran simultaneously with A, B and C respectively.

after preparation, the proteins moved scarecely on electrophoresis at $I=0.5$ (Curve A). However with the solution stored for 2 days, an amount of proteins moved on electrophoresis (Curve B), and these mobile components increased in amount when tested after 8 days (Curve C). In parallel to these changes, the preparation, which gave at the beginning a salting-in curve like Curve B of Fig. 4, underwent during storage a change in salting-in curve similar to the case of Fig. 2. These results might suggest that new components such as Components II and III described above have been formed during storage.

Discussion

The results of the present study showed that, though the dissolution-reprecipitation method is useful for purifying M-actomyosin of squid, repeating precipitations can not completely remove an small amount of the component which seems soluble in lower ionic strengths and that M-actomyosin is considerably unstable and becomes more soluble during cold storage or becomes less soluble by precipitation.

Why the easily soluble component could not be removed completely by repeated precipitations? For this, some explanations are thought out. Firstly, M-actomyosin preparation might contain an impurity which is hardly separated by the method employed here. Secondly, for M-actomyosin is unstable, it might be changing into secondary products during the process of purification. Thirdly, because M-actomyosin of squid might have by nature a small but a definite solubility at a lower ionic strength and at pH~6.8, a complete insolubility such as known for the case with rabbit actomyosin[3] might not be observed even when a considerably pure preparation of M-actomyosin might have been tested. These points must be studied by use of other proper methods.

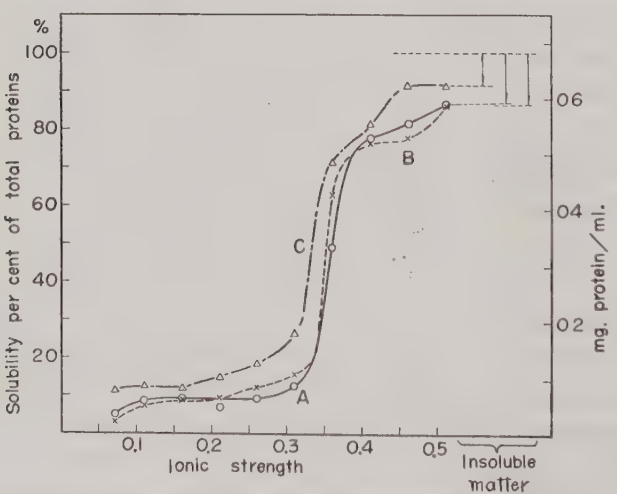


Fig. 7. Salting-in curves of a preparation of Carp actomyosin during cold storage.
Homogenized 5 min. with 0.6M KCl, precipitated at 0.2M, and washed twice with 0.2 M KCl.
Curve A, Immediately after preparation;
Curve B, 4 days after preparation;
Curve C, 8 days 〃 〃 .

It was reported by HASSELBACH *et al*[3]. that rabbit actomyosin did not show any change in salting-in curve as long as 9 days when it was stored at $I=0.4$ and pH~7. With actomyosin of carp, the salting-in curve did not show any practical variation for 3 days, and changed only slightly if tested after 8 days[5] (Fig. 7). Hence the instability of M-actomyosin obser-

ved here seems to be a characteristic of this protein.

Occasionally salting-in range is written as one element in identifying the myosin or actomyosin of rabbit and other animals. If salting-in range is so defined as to denote the range extending from the lowest ionic strength where salting-in begins to the highest where it ends, and if Component I corresponds to M-actomyosin itself, results of Figs. 1~5 suggest that salting-in range of M-actomyosin appears to cover the ionic strengths from 0.2 to 0.5. Within this range, the salting-in range of individual preparation may vary case by case, possibly according to the ionic strength at which reprecipitation was done, though other factors may be influencial.

The salting-in range of rabbit actomyosin has been reported to be 0.24~0.5 (0.24 ~0.34 at pH~6.7[3], 0.3~0.5 at pH~7[6),7)]) and that of carp actomyosin, 0.2~0.5 (0.2 ~0.4[2], 0.24~0.35[8),9)] 0.3~0.5 in Fig. 7 of the present work). These data suggest that the behavior of actomyosins of rabbit and carp also changes with testing method and with preparation. At any rate, M-actomyosin of squid appears not very different with regard to salting-in range from actomyosins of rabbit and carp.

Summary

1) As far as the salting-in curve is concerned, it appeared that 2 or 3 components are contained in M-actomyosin preparation obtained by adding KCl to the streaming birefringent aqueous extract of squid muscle. Among these components, Component I which is least soluble in lower ionic strengths (I) was found to be responsible for the characteristic responses to ATP and thus was inferred to be M-actomyosin.

2) Observations were made and discussed on the purification of Component I by reprecipitation. Thus it was inferred that reprecipitation is useful for purification, but that it is questionable if the purification was complete or not. It was also found that Component I is considerably unstable and is apt to change its solubility behaviors which is not the case with rabbit and carp actomyosins.

3) The salting-in range of M-actomyosin of squid was found to cover $I = 0.2 \sim 0.5$. In this respect, it appeared not very different from rabbit or carp actomyosins.

The author wishes to express his gratitude to Dr. M. Migita for his valuable advice, to Prof. S. Mizushima for his encouragement, and to Miss M. Akiba for her technical assistance.

References

1) Migita, M. and Matsumoto, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 641~52 (1954).
2) Matsumoto, J. J.: *Ibid*, **23**, 92~104 (1957).
3) Hasselbach, W., Hofschneider, H. P., Kasper, E. and Lutz, R.: *Z. Naturforsch.*, **8b**, 204~211 (1953).
4) Matsumoto, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **23**, 775~81 (1957).

5) Ishino, A.: Unpublished data.
6) Weber, H. H. and Portzehl, H.: Advances in Protein Chemistry, **7**, 196, 198 (1951).
7) Bailey, K.: "The Proteins" Vol. II, Part B, Academic Press, New York (1954), p. 961.
8) Roth, E.: *Biochem. Z.*, **318**, 74~94 (1947).
9) Hamoir, G.: "Contribution a l'etude des proteines musculaires de poisson", Imprimerie H. Vaillant-Charmanes, Liege (1955), p. 87; *Arch. intern. physiol. et biochim.*, **63**, suppl. (1955).

イカ肉ミオシン区蛋白の特異性について—Ⅰ.

ミオシン区蛋白の沈澱性状の時間的変化*

右田正男・松本重一郎・青江憲道**・最首とみ子***
(東海区水産研究所)

On a Specific Behavior of "Myosins" of Squid Muscle—Ⅰ. Precipitability of "Myosins"†

Masao Migita, Juichiro J. Matsumoto, Norimichi Aoe** and Tomiko Saishu***

It was found in preliminary experiments that "myosins" of squid muscle are apt to become soluble at lower ionic strengths (I) and often escape from estimation (Table 1). The present work was planned to comfirm this and to find factors involved in this change.

The muscles of different freshness were extracted with KCl-phosphate buffer of I=0.6 and pH~7.5, myosins in the extract being determined by dilution method in three ways, immediately after the extraction, after keeping it at 30°C. for 2 hr., and after 2 day cold storage. In every case, myosins were precipitated at pH 6.5, 7 and also 9 (Fig. 1).

Myosins of squid was found to become less precipitable, unless the extract was diluted immediately after extraction. This change was more marked in media of pH higher than 7, and when the used muscle was not fresh (Figs. 3 and 4). Consequently in determination of myosins in squid muscle, myosins should be precipitated immediately after extraction and at pH near and not excceeding 7.

Observation of streaming birefringence of the extract suggested that asymmetry of dissolved proteins might hardly change even under the above condition which causes decrease of precipitability of myosins in the extract.

With carp muscle, on the other hand, no such marked change in amount of precipitating myosins was observed (Figs. 6 and 7).

† A protein fraction which precipitates at lower ionic strenghts (I=0.05~0.2) from salt-extracts was called here "myosins".

肉中の蛋白質の組成を知ることは魚介肉の肉質の特性とその変化を認識するための出発点といえる。肉の蛋白組成を定量するためには Weber[1] ら Smith[2] やが行つた方法が最もよく知られているが近くは Hasselbach ら[3] や Robinson[4] の方法もある。又 Dyer ら[5]は Smith の方法の一部を改めた方法によつて cod 肉を分析し，この方法は他の研究者[6][7]によつても用いられた。

われわれははじめイカ肉の蛋白組成の概要を知るべく，Smith にならい 10 % KCl, 7 % LiCl 等の溶液によつて蛋白を抽出し，これを 10 倍に稀釈して生ずる沈澱をミオシン区蛋白****とし，沈澱せる部分を非ミオシン区蛋白として分画定量を試みた処，Table 1 の如く肉蛋白は多量に抽出されたにも拘らず，ミオシン区蛋白は甚だ少い結果をえたので，はじめはこれがイカ肉の蛋白組成の特徴であるかと考えた[9]。北林[6]も Dyer らの方法による分画を試みてイカ肉のミオシン区が異常に少いことを報じた (Table 1).

1957 年 12 月 20 日受理

* 東海区水産研究所業績 B 第 277 号，昭和 30 年 4 月日本水産学会年会にて講演，

** 現所属 関東有機株式会社. *** 現所属 西海区水産研究所，旧姓新井. **** サケ・マスやコイの場合にはこの分画にミオシン (Weber[8] の L-ミオシン) とアクトミオシンが共に含まれる。

Table 1. Amount of myosins in squid muscle obtained by dilution methods in earlier studies

Extractant	Extracted proteins*	Condition of precipitation	Myosins precipitated*	Note
7% $LiCl_2$ (I=1.65)	73	I=0.165	14	The authors
	69	I=0.165	0	〃
10% KCl (I=1.34)	72	I=0.134	17	〃
	65	I=0.134	20	〃
5% NaCl+0.02 M $NaHCO_3$ (I=0.88)**	58	I=0.088	9	〃
	57	I=0.088	45	〃
5% NaCl+0.02 M $NaHCO_3$ (I=0.88)**	97	I=0.088	9	KITABAYASHI[6]

* Figures denote percentage to total muscle proteins.

** DYER's solution, whose pH was not kept stable beneath pH 7.8 in spite of the conditions recommend by DYER for keeping it between 7 and 7.5.

しかしながら数多くの実験を繰返した結果，イカ肉抽出液には本来ミオシン区蛋白が少ししか含まれていないのではなく，実験条件によつては多量のミオシン区蛋白がえられることが判つた。この点に注意しつつ観察を進めた結果，稀釈時のミオシン区蛋白の沈澱性は肉の鮮度，抽出後稀釈までの保存温度，時間，沈澱時の pH 等の諸因子が関係しているように見えたので，これらを一括して検討するためこの実験を行つた。

上記の如き実験条件によるミオシン区蛋白値のかかる変化は畜肉についても魚介肉についても報じられた例がないが，それが果してイカ肉ミオシン区蛋白の特性であるか否かを確かめるために魚介肉の中で比較的よく研究されているコイ肉[10][11][12][13]を選んで対照とした。

実　　験

実 験 法

実験材料　スルメイカ *Ommastrephes sloani pacificus* STEENSTRUP は1月に真鶴に於て定置網で漁獲された体重 333～370 g のもの4尾（♂2，♀2）を，捕獲1時間後に魔法瓶中に氷蔵し，それより4時間後，まだひれや上皮の色素細胞が刺戟に対する反応性を残している間に外套膜をとり剝皮した。この試料を低温区（−3～+1°C）と，常温区（10～17°C）に分けて保存し，一定時間毎に各々の区から試料を切りとつて，後に記す如き抽出と分画定量を行つた。

コイ *Cyprinus carpio* は生きている個体（♀），体重 755 g のもの1尾を実験の開始直前に断頭して殺し，背側筋をとり出し，上と同じように低温区（4～4.5°C）と常温区（8～16°C）に分けて保存し，同様な実験を行つた。時期は2月であつた。

抽出法　肉を包丁でたたき，10.0 g を採取し，乳鉢でくずし，氷冷 KCl-りん酸塩緩衝液（イオン強度，I=0.45+0.15=0.6, pH 7.5）200 m*l* を加え，氷浴を付けた簡易ブレンダー[14]によつて 10 分間抽出し，3～10°C の室で 4,000 r.p.m.（1,500～2,800 *g*）にて 20 分間遠心分離し，抽出液 *L* をえた。

ここに緩衝剤としてりん酸塩を用いたのは，後述の如く稀釈液の pH を 6～9 の間で調節するためには，従来筋肉蛋白の溶解のために度々用いられている緩衝剤の中でこれが最も適当であると考えられたからである。

抽出液の処理（Fig. 1）　抽出液 *L* を3分し，無処理区（A）は抽出液の遠心分離が終るや否や直ちに分画定量を行い，加温区（B）は抽出液を 30°C の温浴中に3時間浸した後に，冷蔵区（C）は抽出液を氷と共に魔法瓶中で2夜（46～48時間）保存した後に各々次の分画定量を行つた。

分画定量法　抽出直後の抽出液（*LA*），又は抽出後夫々の処理を施した抽出液（*LB* 及び *LC*）より各

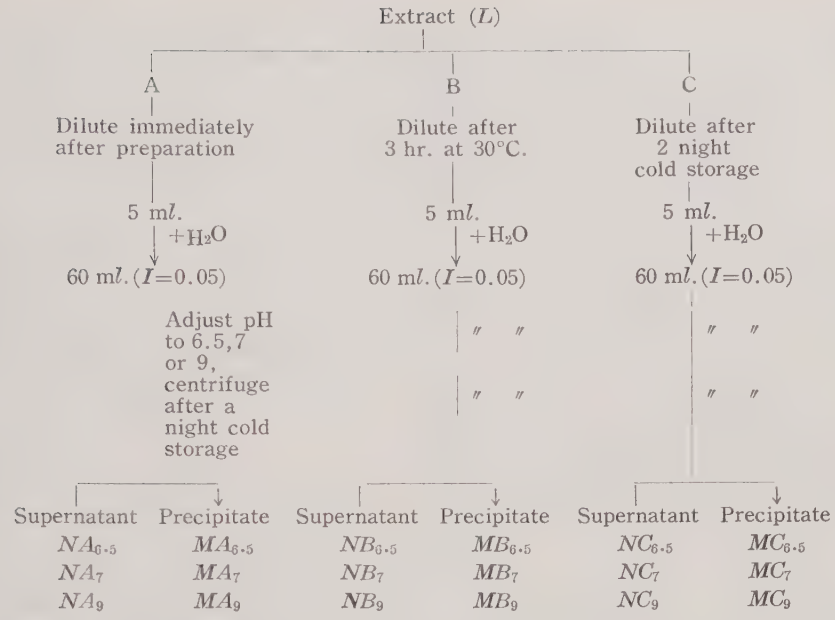


Fig. 1. Treatments of muscle extracts and fractionation.
Figures suffixed denote pH values where "myosins" are precipitated.

3ケの試料を 5 m*l* ずつとり，これに冷蒸溜水 55 m*l* を加え $I=0.05$ とし，各々の pH をガラス電極 pH メーターで測りながら 0.1 N HCl 又は 0.1 N NaOH を加え，3ケの稀釈液の pH を 6.5, 7 及び 9 に合せ，1夜（18～20時間）冷蔵後 4,000 r.p.m. で 20 分間遠心分離し，得られた沈澱に 0.1 N NaOH を加え一定量の溶液として定量しミオシン区 ***M*** とし，上ずみを非ミオシン区 ***N*** (***L*** − ***M*** より算出）とした。また稀釈液の pH は1夜冷蔵中に移動して新たな平衡に達するので遠心分離後に再び測定した。

結果はいずれも一般に肉中全蛋白に対する百分比で表わした。

ミオシン区蛋白を沈澱せしめるためのイオン強度（I）として SMITH[2] は 0.134～0.165, DYER ら[5] は 0.088 を用いているが，ウサギやコイのミオシンは $I=0.04$～0.05 のときに塩溶 (salting-in) がはじまるといわれ[8][15]，イカ肉においてもコイ肉においてもミオシン区蛋白は一般に $I=0.1$ よりも $I=0.05$ の方が溶解度の小さいことが実験的に確認されたので[16][17][18]，I が 0.05 となるような稀釈条件を選んだ。

定量法　一般に前報[18]と同じ方法によつた。

pH の測定には Beckman G 型ガラス電極 pH メーターを用い，又試料とした肉の鮮度の目安として微量拡散法により揮発性塩基N を定量した。

実 験 結 果

イカ肉　実験のはじまりにはイカ肉は極めて新鮮で皮膚は鮮かなとび色であり，肉質は透き通るようであつた。これを低温区と常温区の2群に分けて保存し，実験開始当日の他に低温区では2日，4日，及び8日後に，常温区では1日及び3日後に肉片を切りとつて分析を行つたのであるが，日を追つて用いられた肉は次の如き五官的変化を示した。

常温区では2日目に既に透明度を失い白色となり，表面には僅かに水分が分離し，4日目には分離水分は著しくなり，且つ僅かに腐敗臭が認められた。低温区では3日目にもまだ透明度が残り，5日目に白色不透明となり水分の分離も僅かに認められたが，腐敗臭は9日目にも感じられなかつた。これらの変化に対応する pH と揮発性塩基N の変化を参考のために掲げると Fig. 2 の如くであつた。

新鮮時の全N は 3.30 %，全蛋白は 15.2 %，蛋白態N／全N は 0.730 であつた。

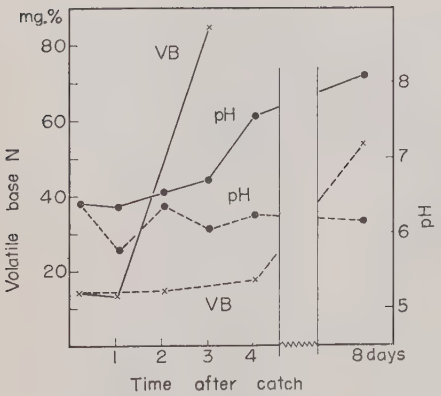


Fig. 2. Changes of pH (●) and of the amount of volatile base-N (VB, ×) during the storage of squid muscle. Full line, at room temperature; broken line, cold storage.

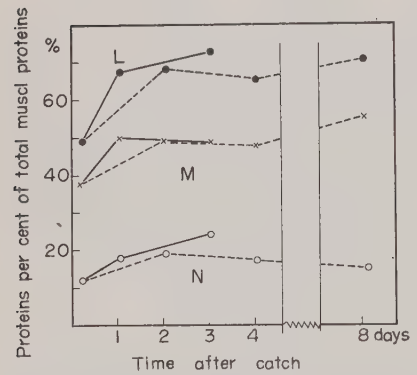


Fig. 3. Changes of protein fractions during the storage of squid muscle.
L (●), extractable proteins;
M (×), myosins at pH~6.5;
N (○), non-myosins (*L*–*M*);
full line, at room temperature;
broken line, cold storage.

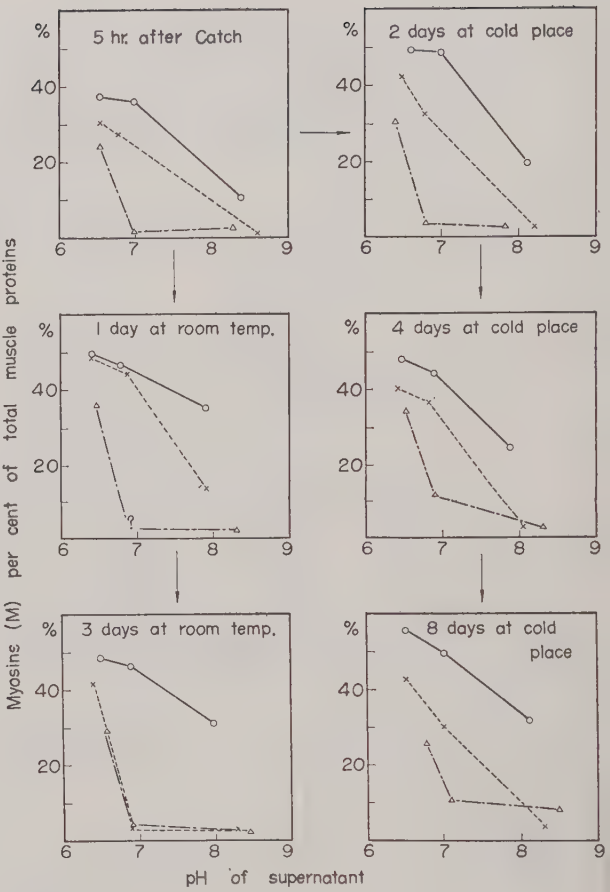


Fig. 4. Changes of the yield of myosins with treatment of extracts and with variation of freshness of material squid muscle.

Description in each partition reffers to the freshness of material muscle from which each extract was obtained.

Curve ——○——, amount of myosins precipitated immediately after extraction (*MA*);

Curve ·····×·····, amount of myosins precipitated after keeping extract for 3 hr. at 30°C. (*MB*);

Curve -——△-——, amount of myosins precipitated after keeping extract for 2 days in ice-box (*MC*).

蛋白溶出量　肉蛋白溶出量と原料肉の鮮度との関係は Fig. 3 曲線 *L* の如く，原肉を放置すると抽出される蛋白の量は増加するが，その増加は肉の放置温度が高いほど速い。

ミオシン区蛋白量　上の抽出液の各々を Fig. 1 の如くに処理してえられるミオシン区沈澱の量と平衡後の上ずみの pH との関係を図示すると Fig. 4 がえられた。

一口にいえばイカ肉は個体の死後時間の経過と共に KCl 溶液への溶解性を増すが，この抽出液から稀釈法によつて沈澱するミオシン区蛋白の量は，抽出直後に稀釈した場合には原肉の鮮度の影響を余り受けないのに反し，各々の抽出液を短時間加温し，又は 2 夜冷蔵した後に稀釈した場合には原肉の鮮度が下るに従つ

て著しく減じる傾向が認められる。

コイ肉　断頭して殺した直後に採取した肉は淡赤桃色で半透明のものであつた。これを保存すると常温区では2日目に肉質がやや軟くなり，4日目にはかなり軟化したが，低温区では3日目に少々の，5日目にはつきりと軟化が認められた。肉色は常温区で5日目に変化がはじまつたが，常温区でも低温区でもそれぞれ実験に用いた範囲，即ち夫々4日目，9日目までは腐敗臭は全く認められなかつた。

これらの試料の pH と揮発性塩基 N は Fig. 5 の如くであつて，どちらの場合にも腐敗は著しくないことがわかる。

この肉は新鮮時に全 N 2.49 %，全蛋白 14.0 %，蛋白態 N/全 N 0.904 であつた。

蛋白溶出量　さて，これらの肉試料からの蛋白の溶出量は Fig. 6 の曲線 *L* の如くであつて，これはイカ肉の場合 (Fig. 3) と同様に鮮度の低下とともに溶出量が増加することを示し，そしてその増加の速さは室温の場合の方が著しいことを示している。

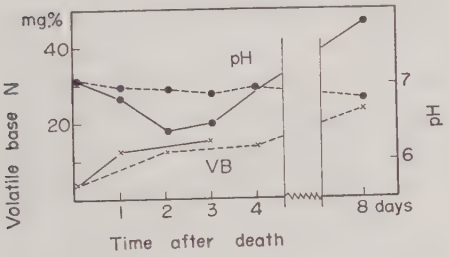


Fig. 5. Changes of pH (●) and of the amount of volatile base-N (VB, ×) during the storage of carp muscle. Full line, at room temperature; broken line, cold storage.

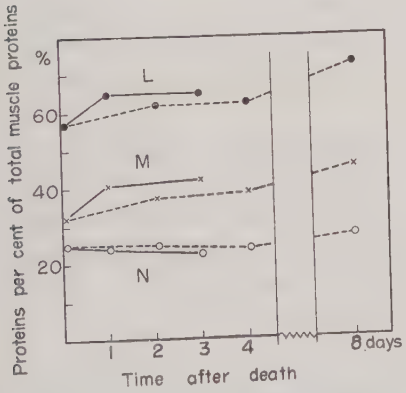


Fig. 6. Changes of protein fractions during the storage of carp muscle.
L (●), extractable proteins;
M (×), myosins;
N (○), non-myosins (*L*–*M*);
full line, at room temperature;
broken line, cold storage.

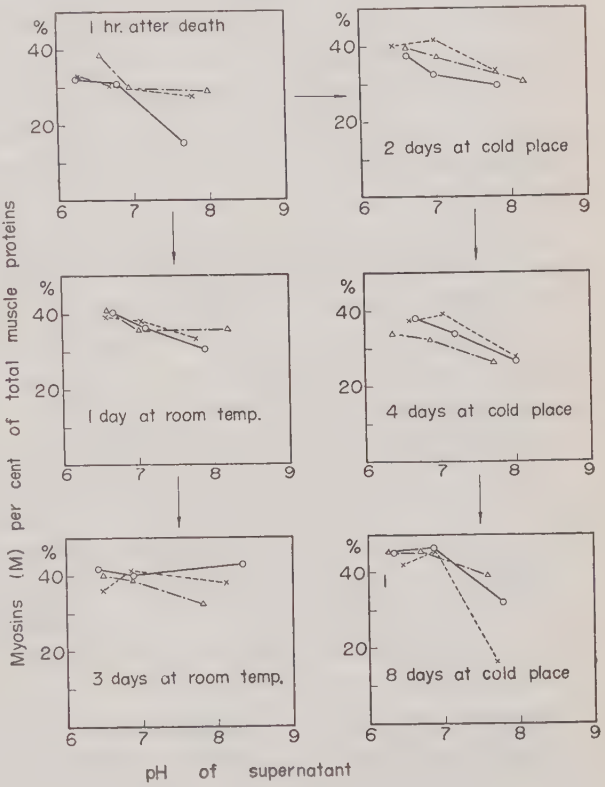


Fig. 7. Changes of the yield of myosins with treatment of extracts and with variation of freshness of material carp muscle.

Description in each partition refers to the freshness of material muscle from which each extract was obtained.

Curve ——○——, amount of myosins precipitated immediately after extraction (*MA*);

Curve - - × - - -, amount of myosins precipitated after keeping extracts for 3 hr. at 30°C. (*MB*);

Curve - -—△- —, amount of myosins precipitated after keeping extracts for 2 days in ice-box (*MC*).

ミオシン区蛋白量　各々の抽出液をイカ肉の場合と同様に処理してミオシン区蛋白を定量したがその結果は Fig. 7 の如くなつた。これによればコイ肉のミオシン区蛋白は pH が高くなると共に沈澱し難くなる点は概ねイカの場合と同様であるが，各々の抽出液を加温又は冷蔵処理したときの影響はみかけのミオシン区蛋白量が減る方向に変つた例もあれば，増えた例もあり，何れにしてもその変化はイカ肉の場合に比べて著しく少く，殊にpH 6.5～7 の間の沈澱量は抽出液の前処理の影響を受けることが少いようである。

考　　察

1)　ミオシン区蛋白の沈澱性　コイ肉のミオシン区蛋白は試料とする肉の鮮度，抽出後稀釈沈澱までの時間，保存温度等によつてその沈澱性にさのみ大きな影響を蒙らないが，イカ肉のミオシン区蛋白は抽出後稀釈沈澱を速かに行わないと沈澱量が減じ，また肉の鮮度が低下する程その影響が著しいことが知られた。はじめに述べたように初期の実験ではイカ肉のミオシン区蛋白が甚だ少なく定量された例もあるが，この原因は，これらの実験は夏期に行われたものが多く，従つて原肉の鮮度は必ずしも優良ではなく，実験中の温度管理には，氷浴や冷蔵庫を用いる等一応の注意はなされていたがそれ以外の注意が不充分であつたためであろう。特に抽出液からミオシン区蛋白を沈澱せしめる場合に抽出後時を移さず稀釈沈澱を行うことの重要性に気付かなかつたことと，抽出液を稀釈したままで pH を調節しなかつたことの影響が大きいと考えられる。

pH の調節が必要なことはいうまでもないが，動物の種類によつてはイカ肉のようにこれに対して特に敏感なものがあるので，一定の分析法をただ形の如くに踏襲するだけではいけないことが明らかになつた。

ここに観察された如くミオシン区蛋白が不安定であつて，ともすれば非ミオシン区蛋白 ***N*** の方に混入して定量値を混乱させ易いことは恐らくイカ肉の特性の一つであろう。先に右田ら[19)20)]は水溶性蛋白の性質に於てもイカ肉に特有な一連の事実を発見したが，塩類溶液によつて抽出されるミオシン区蛋白にもこのように著しい特性があるように考えられる。

2)　稀釈沈澱を行う pH 及びイオン強度　Fig. 4 と Fig. 7 に於て pH～6.5 の沈澱量は多くの場合 pH～7 の沈澱量よりも僅かに多いことは，pH～6.5 に於ける方がミオシン区蛋白がより完全に沈澱せしめられていることを示すであろう。SARKAR[21)]によるとウサギ肉においても，0.05 M の KCl 存在の下におけるミオシン及びアクトミオシンの最大沈澱点は明かに pH 7 よりもやや低い。

WEBER[24)]によれば非ミオシン区蛋白に属するミオゲンの等電点は pH 6.3 であるが，その pH に於てもミオゲンは高濃度の $(NH_4)_2SO_4$ の存在によつて沈澱せしめられているのであつて，ただ pH を等電点にもたらしただけではミオゲンは沈澱しないはずである。故に Fig. 4 及び 7 に於て pH～6.5 で沈澱量がふえているのはミオゲンの混入のためではない。

SMITH[2)]はウサギ肉のミオシン区蛋白の精製試料の KCl，又はLiCl 抽出液を pH 7 で $I = 0.134$(KCl)～0.165(LiCl) で沈澱せしめ，又 DYER[3)] は cod 肉の同様試料の NaCl 抽出液を pH 7，$I = 0.088$ で沈澱せしめたが，いずれもミオシン区蛋白の中の 12 % が上澄中に残存すると報じ，この補正項を加えて抽出液中のミオシン区蛋白の値とすることを推奨している。前述の如く沈澱時のイオン強度を 0.05 附近にもたらせば 0.1 附近の場合よりも沈澱が増え，また pH を ～6.5 に下げることも Fig. 4 及び 7 にみられる如く沈澱量を増加せしめるから，$I = 0.05$ に於て pH～6.5 に下げた値をみれば，上の補正項の値はもつと小さくなると考えられる。

3)　原肉の鮮度とミオシン区蛋白量との関係　Fig. 4 及び Fig. 7 の図上より Fig. 1 の $MA_{6.5}$ に相当する値をとつて原肉の鮮度との関係を求めると Fig. 3 及び Fig. 6 の曲線 ***M*** がえられる。これによればイカ肉に於てもコイ肉に於ても極めて新鮮な肉に比べ，死後時間を経過した肉ではミオシン区蛋白 ***M*** の量が増し，その増し方は肉を常温で放置したときの方が低温で放置したときよりも速かである。既に実験結果の処で記した如く，イカ肉でもコイ肉でも，2 日目以降の試料は 1 日目の試料に比べて肉質が軟くなつていたから，これがミオシン区蛋白の溶出量の増加の主な原因であろう。

4) 非ミオシン区蛋白の量　ミオシン区 M の変化即ち曲線 M を抽出液中に溶出した塩溶性区 L の変化即ち同じ図の曲線 L と比較すると，夫々の図に於て室温又は低温における夫々の曲線 L と M の間にほぼ平行関係がみられる。従つて非ミオシン区蛋白 $N=L-M_{0.5}$ の値を図に示すと Fig. 3 及び Fig. 6 の曲線 N のようになる。このことから，塩溶性区蛋白 L が死後肉の放置中に増加するのは，主としてミオシン区蛋白 M が溶け易くなつたためであつて，非ミオシン区蛋白 N は原肉の鮮度がごく良い場合でもはじめからその大部分が溶出することが推定される。

Fig. 6 のコイ肉では N は全蛋白の 23～27 % であつてその中低温区 9 日目の値を除けば 23～25 % に入るからこの値が肉中の非ミオシン区蛋白の量にほぼ相当するものと考えられる。

一方イカ肉 (Fig. 3) では常温区でも低温区でも肉の放置とともに N の値が増加しており，はじめ肉中全蛋白の 12 % であつたものが常温区 4 日目では 24 % にまで増加している。この中でどの値が新鮮なイカ肉中の真の含量に相当するかを定めるべき根拠は今日未だ不充分であるが，沈澱性の低下した M が N 中に混入しているとそれもまたみかけのミオシン区蛋白の沈澱量－pH 曲線 (Fig. 4) に著しい変化を示しているような肉（常温区 4 日目，低温区 9 日目）はまず除外するならば，N は 12～19 % の間となる。

5) イカミオシン区蛋白溶液の SB の変化　イカのミオシン区蛋白が抽出液に溶解した状態で保存されると，初めに比べ沈澱し難く，即ち溶け易くなることは，その間にミオシン区の蛋白分子自体の状態が何等かの変化を蒙つたことを示している。これに関して抽出液の流動複屈折 (SB) の強さについての次の如き観察は蛋白分子の分散状態についていささか示唆を与えるようである。即ち 1 日目のイカ肉よりえた抽出液を (a) そのまま，(b) 30°C に 30 分加温，(c) 4 日間冷蔵したものについて夫々 0.5 M KCl で 2 倍ずつの階段稀釈を行つて SB のつよさをしらべると，(a) と (b) とは同じ強さの SB を示し，4 日間冷蔵したものは却つて SB がつよい。

次に各抽出液を水で階段稀釈を行うと SB は (a)＜(b)＜(c) の順となり，また (a) は 4 倍，(b) は 8 倍の稀釈液を 1 夜放置すると蛋白の沈澱が生ずるが，(c) は 16 倍にうすめても沈澱を生ぜず蛋白は安定なゾルを作つていた。

2 日目以降のイカ肉からえた抽出液では抽出直後に水で稀釈したときも 0.5 M KCl による場合と大体同じ強さで SB が認められ一夜後にしらべると蛋白が沈澱している場合と沈澱していない場合とが認められた。水で稀釈した場合の安定度は前述の如きミオシン区蛋白の沈澱性の変化の別の一面であるが，かくの如く沈澱性に著しい変化が認められるにかかわらず SB の変化はこれにくらべるとごく少い。このことはイカ肉抽出液の取扱い方によつて沈澱性が変化するときにも蛋白分子に非対称度を減ずるような変化が起つていないことを示唆している。

SB の黒十字像を検出しうる最低蛋白濃度はイカミオシン区蛋白の 0.23～0.75 mg/ml に対し，コイ肉では 0.7～2.3 であつて，イカ肉より SB が弱いと考えられる。コイ肉の抽出液を 0.5 M KCl 又は水で階段稀釈すると後者の方が SB が弱い目であり，かつ蛋白は 1 夜後に沈澱しており，抽出液を加温又は冷蔵した場合にもその沈澱性に変化がなく，SB の強さにもあまり変化が認められなかつた。

要　　約

1. 鮮度の異なるイカ肉及びコイ肉を KCl 溶液 ($I=0.6$, pH 7.5) で抽出して塩類抽出液 L をえ，これから種々の条件の下でミオシン区蛋白を稀釈沈澱 ($I=0.05$) させ，その結果を比較した。

2. イカ肉の抽出液を調製後速かに稀釈沈澱させた時にくらべ，抽出液を 3 時間 30°C に加温，又は 2 夜冷蔵後に稀釈沈澱させた場合には，そこに沈澱するミオシン区蛋白 M が少量となる傾向があらわれ，かつこの傾向は肉の鮮度が低い程著しいことが判つた。

3. コイ肉のミオシン区蛋白の沈澱量は抽出液の稀釈時期，稀釈前の処理，肉の鮮度によつて特に一貫した傾向の変化を示さず，その変化の度もイカ肉の場合に比べて無視すべき程少なかつた。

4. 実験の結果に基きイカ肉及びコイ肉の塩類抽出液中蛋白の分画定量法の実験条件及び結果の解釈につ

いて考察した。

文　　献

1) WEBER, H.H. and MEYER, K,: *Biochem. Z.*, **266**,, 137～152 (1933).
2) SMITH, E.C. Bate-: *Proc. Roy. Soc.* (*London*), **B 124**, 136～50 (1937).
3) HASSELBACH, W. and SCHNEIDER, G: *Biochem. Z.*, **321**, 461～75 (1951).
4) ROBINSON, D.S.: *Biochem. J.*, **52**, 621～8 (1952).
5) DYER, W.J., FRENCH, H.V. and SNOW, J.M: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **7**, 585～93 (1950).
6) 北林邦次: 北水研々究報告, No. 11, 102～4 (1954).
7) NIKKILÄ, O.E. and LINKO, R.R.: *Food. Res.*, **19**, 200～5 (1954).
8) WEBER, H.H. and PORTZEHL, H.: Advances in Protein Chemistry, **7**, 161～247 (1952).
9) 右田正男: 本誌, **18**, 558～68 (1953).
10) 森高次郎・浅川末三: 本誌, **12**, 62～72 (1943).
11) 須山三千三: 本誌, **15**, 507～14 (1948).
12) ROTH, E: *Biochem. Z.*, **318**, 74～94 (1947).
13) HAMOIR, G.: Advances in Protein Chemisthy, **10**, 227～88 (1955).
14) 松本重一郎: 化学の領域, **9**, 202～3 (1955).
15) BAILEY, K.: "The Proteins", Vol. II, Part B, Academic Press, NewYork (1954) p. 961.
16) 松本重一郎: 日本水産学会年会発表, 1957 年 4 月 3 日 (印刷中)
17) 石野あや子: 未発表; MATSUMOTO, J.J., 本誌, **24**, 19～26 (1958). に引用
18) 右田正男・松本重一郎・: 本誌, **22**, 561～8 (1957).
19) MIGITA, M. and MATSUMOTO, J.J.: 本誌, **20**, 641～52 (1954).
20) MATSUMOTO, J.J.: 本誌, **23**, 92～104 (1957).
21) SARKAR, N.K.: *Enzymol.*, **14**, 237～45 (1950).
22) WEBER, H.H.: *Biochem. Z.*, **158**, 443～72 (1925).

On Actomyosin of Squid Muscle from Salt-Extract —Preparation of Actomyosin*—

Juichiro J. Matsumoto
(*Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*)

In squid muscle, a water-soluble fibrous protein was found to exist which showed responses to ATP like actomyosin, and it was called M-actomyosin[1)2)]. The amount of the water-soluble proteins by repeated extractions was as high as 50~55 % to total muscle proteins[1)]. If it was assumed that a part of the water-soluble protein fraction was composed of non-myosins** as much as ~20 % of the total muscle proteins according to the fractionation of the salt-extracts[1)], the difference between the water-soluble fraction and non-myosins, about 30 %, might correspond to M-actomyosin which was extracted with water. On the other hand, the yield of M-actomyosin preparation from aqueous extracts was 1~9% of the total muscle proteins[1)2)3)], while fractionation of the salt-extracts of the squid muscle suggests that more than 60 % of the total muscle proteins are composed of myosin-like globulins[4)]. Hence, it was questioned whether the bulk of the structural proteins is composed exclusively of M-actomyosin, or it contains, besides M-actomyosin, other proteins, *e. g.*, an ordinary actomyosin as that of rabbit or carp.

If there exists, in squid muscle, an actomyosin which should have the same solubility behaviors as rabbit or carp actomyosin, it must be prepared by the same method from squid muscles.

By comparing the characteristic functional properties of these proteins, it will be tested whether the squid protein is identical with M-actomyosin or not. In the present report, trial for separating actomysin of squid and some observation on the preparation obtained are described.

Experimental

Methods

The most part of the methods employed are the same as the previous reports[1)2)].

Received Dec. 20, 1957.

* Contribution B No. 278, from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo. Read before the Annaul Meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries, April 3, 1957.

** The word "non-myosins" includes albumins such as myogens and myoalbumin, and, globulin X. The soluble fraction at low ionic strengths (I=0.05~0.1) in salt-extracts of muscle is believed to correspond to non-myosins.

Materials: Mantle muscle of common squid, *Ommastrephes sloani pacificus* STEENSTRUP, which were caught from October to February, were used. The body weight ranged from 310 to 640 g. and pH of the muscle was 6.2～6.9.

RESULTS

(A) The ordinary method to separate actomyosin

The method which has been used most commonly[5] is based on long extraction of SZENT-GYÖRGYI[6] followed by separation and purification of actomyosin as described by GREENSTEIN *et al.*[7] Thus, minced squid muscle was extracted with 5 times (v./w.) of WEBER-EDSALL's solution (0.6 M KCl, 0.04 M Na_2CO_3, 0.01 M $NaHCO_3$) for 20 hours at cold place, with constant gentle stirring. The mixture was centrifuged for 20 min. by ～4,000 r. p .m. (1,500～2,800 *g*), giving an opalescent viscous extract, S_1, which showed an intense streaming birefringence (SB). When the extract was diluted with water to 0.1 M KCl concentration and adjusted to pH 6.5 with 6% acetic acid and centrifuged, the proteins of squid did not deposit well but some amount of loose, swollen precipitate, P_2, was found and the boundary between the supernatant and the precipitate was not sharp, though actomyosins of rabbit and carp always did separate sharply as the precipitate. Supernatant at 0.1 M KCl concentration of squid extract showed an intense SB which suggested that a considerable amount of the fibrous proteins remained in solution. For it was suspected that the ionic strength (I) of precipitation was not proper, the extract S_1, was diluted to 0.05 ionic strength. The amount of the precipitate here, P_3, was larger than the precipitate P_2, and SB of the supernatant was less intense. However, when the precipitate, P_3, was dissolved in 0.6 M KCl and then diluted to 0.2 M (pH～6.3), no precipitate was formed. This suggests that the protein in P_3, is not the same as rabbit actomyosin. The yield per g. muscle was 77 mg. for S_1, 24 mg. for P_2, and 52 mg. for P_3, respectively. When the precipitate P_2 was dissolved in 0.6 M KCl, a salting-in curve as shown in Curve A of Fig. 1 was obtained. This curve suggests that from the extract S_1 no protein might be obtained which resembles rabbit actomyosin.

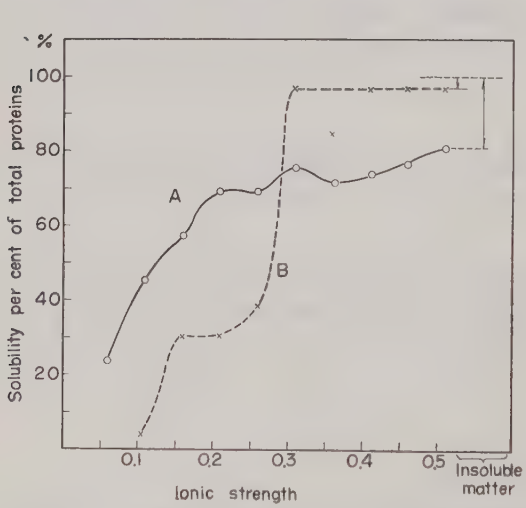


Fig. 1. Salting-in curves at pH～6.8 of actomyosin preparations obtained by prolonged extraction with WEBER-EDSALL's solution (Curve A) and with 0.6 M KCl solution (Curve B).
Protein concentration in the mixture:
Curve A, 0.38 mg./m*l*.; Curve B, 0.22 mg./m*l*.

(B) Long extraction with 0.6 M KCl

It was reported by WEBER[8)9)] and BAILEY[10)], that at higher pH and at higher ionic strength, rabbit actomyosin is apt to be denatured and to dissociate irreversibly into actin and myosin, and also that actin is denatured during the extraction with alkaline media and remains in supernatant when the extract was diluted for separating actomyosin. It was found by the author, that if the salt-extract of squid muscle was stored for a period myosins* are apt to become less precipitable at the lower ionic strength[11)] (I=0.05). As the pH value of the above extract of squid muscle with WEBER-EDSALL's solution was found to be 8.2, the alkaline reaction might be responsible for the failure in separating actomyosin. Thus, 0.6 M KCl solution was used in place of the ordinary WEBER-EDSALL's solution. To remove the soluble proteins more effectively, precipitations were done at 0.2 M KCl concentration from the first step, and repeated twice at the same ionic strength.

The extract S_1, whose pH was 6.3, was diluted and centrifuged, supernatant being readily separated from the precipitate. The 0.6 M KCl solution of the precipitate P_1 obtained after 3 times reprecipitations gave a salting-in curve shown in Curve B of Fig. 1. While a larger part of the precipitate showed salting-in at I=0.2~0.3 and seemed to be the proteins corresponding to actomyosins of rabbit and carp, a considerable amount of another component was found which is soluble in lower ionic strengths. Probably, the actomyosin of squid was caught but the impurity was not removed. The yield per g. muscle was 94 mg. for the extract S_1, and 32 mg. for the precipitate P_1 (concentration 2.2 mg./ml.), and those of the dissolved proteins in the supernatants were 22 mg. for S_2, 20 mg. for S_3, and 14 mg. for S_4, respectively. It must be noted that SB was found in these three supernatants obtained by repeating precipitations. This suggests that some fibrous proteins have remained dissolved in the supernatant.

(C) Short extraction with 0.6 M KCl

The inhomogeneity of the preparation obtained by the long extraction with 0.6 M KCl might be due to some change or denaturation of the protein during extraction described above[8)10)]. So the duration of extraction was reduced to 10 min.**, using the same extractant. For this extraction, a blendor equipped with an anti-foam baffle plate[1)] was used to help the degradation of tissue. Method of preparation and its result were shown in Fig. 2 and in Table 1, respectively. On dilution succeeded by centrifugation, the precipitates were more compact compared with the cases of long extraction, and the supernatants were easily separated from the precipitates. The solution in 0.6 M KCl of the precipitate P_1 was opalescent, highly viscous, and intense-

* As in the previous report[1)], the word "myosins" was used here to comprehend the structural globulins of muscle, such as myosin and actomyosin.

** The later experiences show that the duration of homogenizing suffices with 30 sec.~3 min. by ca. 10,000 r. p. m.

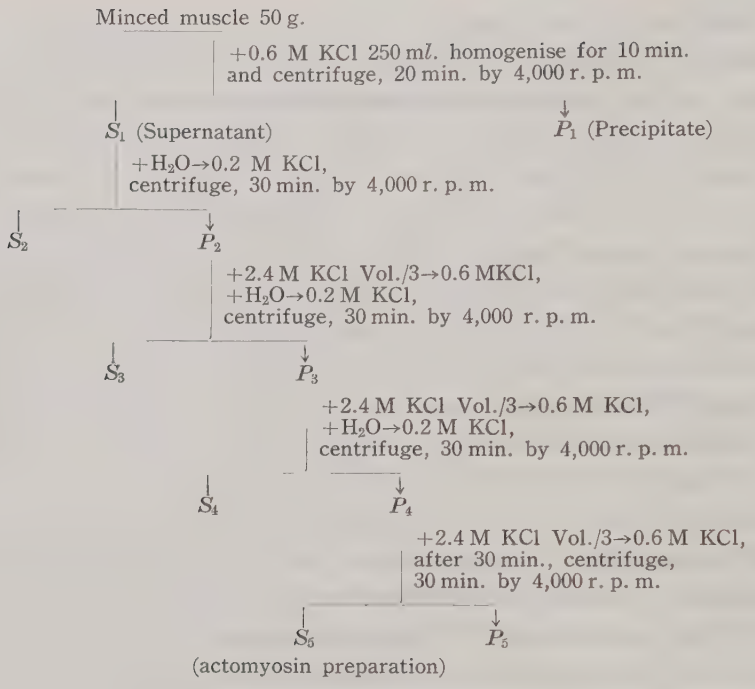


Fig. 2. Preparation of actomyosin of squid muscle.

Table. 1. A quantitative aspect of the preparation of actomyosin of squid muscle*

Fraction	pH	SB	Concentration	Yield	
			mg. protein/ml.	mg. protein per g. muscle	% of total muscle proteins
S_1	6.4	+ (intense)	13.7	142.6	95
S_2	6.3	–	1.36	31.9	21
S_3	6.3	–	0.39	7.4	5
S_4	6.2	–	0.18	4.3	3
S_5	6.3	+ (intense)	8.70	89.4	60

* pH 6.7.

** Total muscle proteins were assumed as 150 mg./g. muscle which is a rough average of many data.

ly streaming birefringent. The salting-in curve of P_4 was shown in Curve A of Fig. 3, which suggests that it was composed of a considerably homogeneous component which has its salting-in range at $I=0.15\sim0.4$ at pH ~6.8. So this fraction might correspond to the actomyosins of rabbit and carp, though the salting-in range appears a little lower than those of actomyosins of rabbit ($I=0.24\sim0.5$[9)10)12)]) and carp ($I=0.2\sim0.5$[2)13)14)15)]). Since the yield of the preparation P_4 amounted to about 60 % of the total muscle proteins as Table 1, and since the supernatants of precipitations at 0.2 ionic strength did

not show SB, it seems that the most part of the fibrous proteins, *i. e.* myosins was brought down in this fraction.

Thus a preparation like actomyosins of rabbit and carp was prepared by a modified method, while the ordinary method could not yield such preparation.

When the salting-in curve of the preparation was compared before and after each precipitation in Fig. 2, it was shown that by each precipitation, the amount of the presumably impure component which was soluble in lower ionic strengths had decreased. However, this component could not be removed completely by three or four times repeated precipitations and also by additional washings with 0.05～0.2 M KCl solutions.

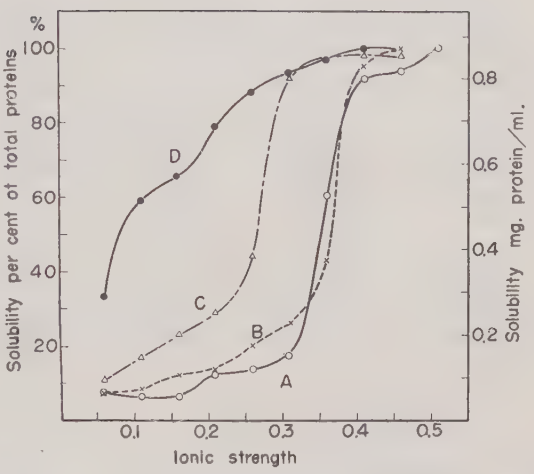


Fig. 3. Salting-in curve at pH～6.8 of actomyosin preparation obtained by short extraction with 0.6 M KCl solution and its change during storage of the preparation.
Curve A, immediately after preparation;
Curve B, 1 day after preparation;
Curve C, 3 days after preparation;
Curve D, 8 days after preparation.

This preparation will be tentatively assumed as "actomyosin" of squid in the present study.

(D) Effect of pH on solubility behaviors of squid actomyosin

Salting-in curves at various pHs of actomysin of squid obtained by the above method were as shown in Fig. 4, and its solubility behavior over a wide range of pH

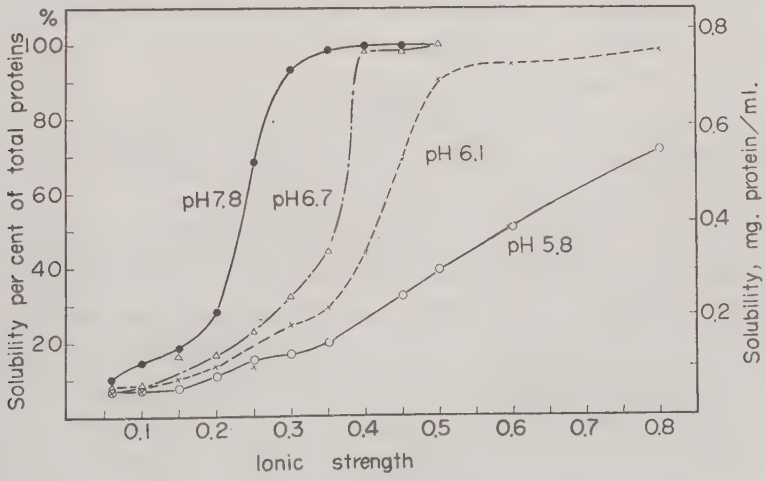


Fig. 4. Salting-in curves at various pH's of actomyosin preparation.

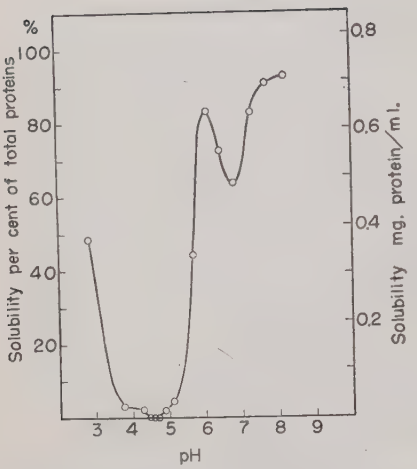


Fig. 5. Solubility of actomyosin preparation at various pH's and at $I=0.4$.

at $I=0.4$ was as Fig. 5.*

Fig. 4 shows that the salting-in range of squid actomysin shifts to the lower ionic strength with increase in pH value, and shifts to the reverse side with decrease in pH value. Also it was shown that, at a considerably low pH (pH~6), a little part of the preparation was soluble at lower ionic strengths. It was also suggested from Fig. 5 that the isoelectric point of squid actomyosin at $I=0.4$ is near pH ~4.6.

(E) The instability of squid actomyosin

If actomyosin of squid was stored in dissolved state in 0.5~0.6 M KCl (pH ~6.5) in cold place, a gradual change of the salting-in curve was found to occur. This suggests that the protein changed into a readily soluble one (Fig. 3).

Discussion

With the present study, a globulin fraction, presumably "actomyosin" of squid was separated and purified to a considerable degree. Although it must be examined experimentally if this preparation is nothing else but the structural protein which is responsible for the contraction of squid muscle, this protein was regarded as actomyosin for the following reasons. Thus, the protein which occupied the larger part of the muscle proteins, was in dissolved state, opalescent, highly viscous and also intensely streaming birefringent. It appears, however, to have three as properties distinct from actomyosins of rabbit and carp. Thus, i) this protein cannot be prepared by the ordinary method for actomyosin but can be obtained by a scheme with some modification; ii) it changes readily in 0.5~0.6 M KCl solution into another protein or another state which is soluble in lower ionic strengths, while no such change has been found on actomyosins of rabbit[12] and carp[15]; and iii) its salting-in appears to begin at a lower ionic strength.

It appears that the second property is responsible for the first, that is, actomyosin of squid was not separated by the ordinary method because it was changed during the long extraction with salt solution. The change of solubility behaviors of squid myosins during the storage of salt-extract[11] might be due to the same property as studied here.

Curve A of Fig. 3 and the curves of Fig. 4 show that a small part of the preparation is soluble in lower ionic strengths, and so even at pH ~5.8. Whether the

* The method used here is the same with that which was used to estimate the iso-electric point in the previous report[2].

soluble fraction is an impurity, or the dissolved part of a homogeneous preparation, cannot be answered in the present stage of knowledge. Some different mechanisms may also be possible. However, it would be worth while pointing out that it did precipitate completely also at $I=0.4$, when pH was as low as near 4.7 (Fig. 5). In Fig. 5, a small valley is found on the curve near pH 7. A similar pattern was found in the swelling curve of whole muscle of squid and fishes which were worked out by Okada *et al.*[16]

The time is not ripe for answering if actomyosin of squid in the present study is identical with M-actomyosin recovered from aqueous extract or not. However, it would be interesting to note that squid actomyosin and M-actomyosin are very similar as far as their lability is concerned.

Summary

1) To separate actomyosin of squid, the ordinary method used for rabbit actomyosin was tried, but the result was not successful.

2) By extracting squid muscle for 10 min. with 0.6 M KCl, followed by precipitating 3 times at 0.2 M KCl concentration, a preparation which is in all probability actomyosin of squid was obtained. The preparation was, if dissolved in 0.5～0.6 M KCl solution, opalescent, highly viscous and intensely streaming birefringent, and also showed its salting-in range at $I=0.15$～0.4 (pH ～6.8).

3) If the protein was stored in dissolved state in 0.5～0.6 M KCl and at neutrality, a change occurred so that it becomes readily soluble at lower ionic strengths. The change appears to be responsible for the fact that squid actomyosin is not separated by the ordinary method.

The author wishes to express his gratitude to Dr. M. Migita for his valuable advice, to Prof. S. Mizushima for his encouragement, and to Miss M. Akiba for her technical assistance.

References

1) Migita, M. and Matsumoto, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 641～652 (1954).
2) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **23**, 92～104 (1957).
3) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **23**, 775-781 (1958); **24**, 29～36 (1958).
4) Migita, M. and Matsumoto, J. J.: *Ibid*, **22**, 561～568 (1957).
5) Watanabe, S.: "Standard Method of Biochemistry", Edited by Akabori, S. *et al.*, Bunkyodo, Tokyo (1953) 245.
6) Szent-Györgyi, A: *Acta Physiol. Scand.*, **9**, Supple., 25～65 (1944).
7) Greenstein, J. P. and Edsall, J. T.: *J. Biol. Chem.*, **133**, 397～408 (1940).
8) Portzehl, H., Schramm, G. and Weber, H. H.: *Z. Naturforsch.*, **5b**, 61～74 (1950).
9) Weber, H. H. and Portzehl, H., Advances in Protein Chemistry, **7**, 217～218, 238 (1950).
10) Bailey, K.: "The Proteins", Vol. II. Part B., Academic Press, New York (1954) 958, 986～987.
11) Migita, M., Matsumoto, J. J., Aoe, N. and Saishu, T.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **24**, 51～58 (1958).

12) HASSELBACH, W., HOFSCHEIDER, H. P., KASPER, E and LUTZ, R.: *Z. Naturforsch.*, **8b**, 204~211 (1953).
13) ROTH, E.: *Biochem. Z.*, **318**; 74~94 (1947).
14) HAMOIR, G.: "Contribution a l'etude des proteins musculaires de poisson", Imprimerie H. Vaillant-Charmanes, Liège (1955) p. 87; *Arch. intern. physiol. et biochim.* **63**, Suppl. (1955).
15) ISHINO, A.: Unpublished data, cf. MATSUMOTO, J. J., *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 29~36 (1958).
16) OKADA, M. and TADA, S.: *Ibid.*, **19**, 178~183 (1953).

On the Protein Composition of Squid Muscle*

Juichiro J. Matsumoto
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

Among the estimation methods so far reported for muscle proteins, those of Weber[1] and of Smith[2] have been well known. In these methods, muscle proteins are extracted with 0.5~1.9 M neutral salt solutions, being divided into several fractions by reduction of the salt concentration of the extracts and by further treatments. With some modification of these methods, protein composition of cod muscle has been estimated by Dyer *et al.*[3] The present paper deals with the analysis of squid muscle proteins following the scheme of Dyer *et al.* According to Dyer's method, muscle proteins are divided into myosin, myogen, myoalbumin, globulin X and stroma. However, since the myosin referred to by Dyer includes some fibrous muscle proteins such as myosin, actin and actomyosin, the word "myosins" is used, in the present paper, to include all of them. For the sake of simplicity, a group including myogen, myoalbumin plus globulin X is also called occassionally by name of "non-myosins".

With regard to the application of Dyer's method on squid muscle proteins, following observations have been made by the author.

i) As myosins of squid were found to be readily changed when they are extracted for long time at higher pH values and at higher ionic strengths[4][5], extraction with 0.6 M KCl solution at pH~6.5 was preferred to Dyer's method employing 5% NaCl at pH~7 (0.88 M).

ii) It was found that in Dyer's condition (ionic strength, $I=0.088$, pH~7), squid myosins are not completely precipitated but more complete precipitation is attained at $I=0.05$ and pH~6.5[4]. Therefore in the present study, the full scheme of Dyer *et al.* was followed, on the one hand, and a method modified in some points was tried on the other hand.

Experimental

Methods

Materials: The used common squids, *Ommastrephes sloani pacificus* Steenstrup, were obtained from wholesale markets. In the former 3 cases among 6 analyses, 2 surface layers of the skin of the mantle were removed and the muscle was used for analysis. In the latter 3 cases, the middle part of the mantle was cut out with razor blade to avoid the contamination with the epithelial tissues. In all cases, sample muscle was minced with a knife and ground with a mortor, being subjected to analysis. For reference, description of sample squids are shown in Table 1.

Received March 3, 1958.

* Contribution B No. 283 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo.

Dyer's method:

A general aspect of this method is shown in Fig. 1.

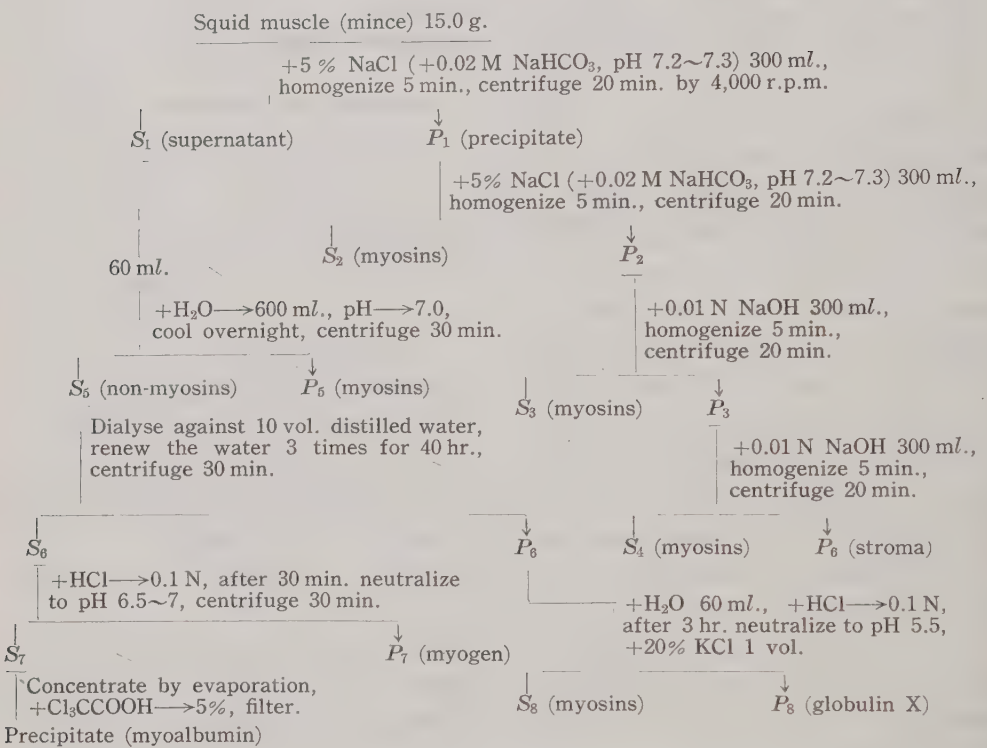

Squid muscle (mince) 15.0 g.
+5 % NaCl (+0.02 M NaHCO3, pH 7.2~7.3) 300 ml., homogenize 5 min., centrifuge 20 min. by 4,000 r.p.m.
S1 (supernatant)
P1 (precipitate)
+5% NaCl (+0.02 M NaHCO3, pH 7.2~7.3) 300 ml., homogenize 5 min., centrifuge 20 min.
60 ml.
S2 (myosins)
P2
+H2O—→600 ml., pH—→7.0, cool overnight, centrifuge 30 min.
+0.01 N NaOH 300 ml., homogenize 5 min., centrifuge 20 min.
S5 (non-myosins)
P5 (myosins)
S3 (myosins)
P3
Dialyse against 10 vol. distilled water, renew the water 3 times for 40 hr., centrifuge 30 min.
+0.01 N NaOH 300 ml., homogenize 5 min., centrifuge 20 min.
S6
P6
S4 (myosins)
P4 (stroma)
+HCl—→0.1 N, after 30 min. neutralize to pH 6.5~7, centrifuge 30 min.
+H2O 60 ml., +HCl—→0.1 N, after 3 hr. neutralize to pH 5.5, +20% KCl 1 vol.
S7
P7 (myogen)
Concentrate by evaporation, +Cl3CCOOH—→5%, filter.
Precipitate (myoalbumin)
S8 (myosins)
P8 (globulin X)

Fig. 1. Estimation scheme of muscle proteins of Dyer *et al.*

i) *Extraction*: Fifteen grams of the muscle was homogenized with 300 m*l*. of salt solution for 5 min. at the lower speed (~10,000 r.p.m.) of a baffle-plated Waring blendor[6], the homogenate being centrifuged for 20 min. at 4,000 r.p.m. (1,500~2,800 *g*).

ii) *Separation of myosins*: Immediately after obtaining the extract S_1, 60 m*l*. of S_1 was diluted with distilled water adding the water dropwise while the protein solution was constantly stirred. Then, the precipitate obtained by centrifugation after a night cold storage was determined and regarded as myosins and its supernatant as non-myosins.

iii) *Fractionation of non-myosins*: The supernatant obtained by centrifugation of the diluted salt extract was dialysed against distilled water and treated as Fig. 1.

A modified Dyer's method:

In the above Dyer's method, following points were modified so as to fit squid muscle proteins.

i) *Extraction*: For 5% NaCl of Dyer, 0.6 M KCl solution containing no buffering agent was used and duration of extraction was shortened to 1 min.

ii) *Separation of myosins*: To 50 m*l*. of the extract, S_1, 550 m*l*. of distilled water was added so that ionic strength was reduced to 0.05, pH being adjusted to 6.5.

Determination of proteins:

Proteins in solution were separated by treating with trichloroacetic acid (final concentration 5%) and washed, being determined by semi-micro KJELDAHL method. Some solutions with low protein concentration were analysed by the biuret method[7]. Nitrogen content in the proteins was assumed as 16.0% for convenience sake.

For total proteins the sum of all fractions was adopted. The relative error between this value and that determined by directly treating the muscle with trichloroacetic acid[8] was, in average of 4 cases, as low as 0.6%, which is negligibly small.

pH: pH was measured by Beckman type G glass-electrode pH meter.

Temperature of experiment: The best part of the experiments were performed in a cold place and under cooling with ice-water, temperature of the sample being not raised beyond 17°C. even after centrifugation.

Salting-in curve: Solubility of dissolved proteins at varying ionic strengths was estimated by the method previously reported as the salting-in range estimation.[9]

RESULTS

Experiment I. Analysis by the DYER's method

Results as Ia and Ib in Table 1 were obtained. The used squids had been transported to the market in ice-water. While the first of them (Ia) was fresh, the other (Ib) appeared to have a softened tissue so that it was suggested that a few days had passed away from the catch.

In Table 1, corrected values for myosins and related fractions were appended in parenthesis, following DYER's assumption that 12% of the total myosins present in the salt extract remains in supernatant when myosins are precipitated.

Experiment II. Analysis by the modified DYER's method

Results as IIa, b, c in Table 1 were obtained. An experiment shown in IId was made to improve the accuracy of stroma value by increasing the used muscle to 30 g. Among the squids used in these analyses, those in IIb and IIc were of a lightly sepia skin, their mantle and fin showing a dull contraction if touched with the fingers.

In both Experiments I and II, about 90% of the total muscle proteins was extracted in the first extract S_1, which was turbid, viscous and showed intense streaming birefringence (SB). The extracts obtained by second or later extractions were lightly or slightly turbid and less viscous, showing no SB. While the residues of the first and the second extractions formed a mass of entangled soft fibres, the residues of the third and the fourth extractions with dilute alkali were translucent loose precipitates.

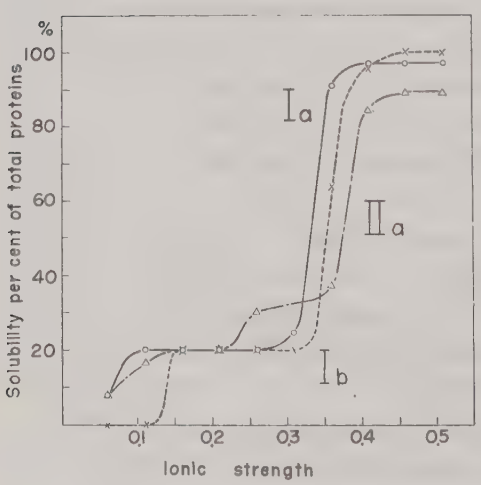
The precipitated myosins obtained from the first extract was a rather translucent paste which showed high viscosity and intense SB if dissolved in 0.6 M KCl.

To test whether this precipitate is truely composed of a fraction of globulin nature

Table 1. Fractionation data of squid muscle proteins estimated after DYER's scheme and by its modification.

	No.	Ia	Ib	IIa	IIb	IIc	IId
	Method	DYER's	DYER's	Modified	Modified	Modified	Modified**
	Myosins pptd. at I	0.088	0.088	0.06	0.05	0.05	—
	Myosins pptd. at pH*	7.2	7.0	6.3	6.9	6.6	—
Partition of protein-N as per cent of total protein-N — Extract	S_1 (non-myosins +myosins, %)	89.3	90.5	87.9	90.1	90.9	89.9
	S_2 (myosins, %)	3.6	2.8	5.8	4.0	5.4	4.9
	S_3 (myosins, %)	2.2	1.5	2.7	1.5	1.0	2.5
	S_4 (myosins, %)	1.0	0.7	1.3	1.2	0.3	0.6
	P_4 (stroma, %)	**3.9**	**4.5**	**2.3**	**3.2**	**2.4**	**2.1**
Fractions	P_5 (myosins in S_1, %)	61.6 (70.1)***	58.6 (66.6)***	69.3	74.4	78.4	—
	$S_5=S_1-P_5$ (non-myosins, %)	**27.7** (**19.2**)***	**31.9** (**23.9**)***	**18.6**	**15.7**	**12.5**	—
	$S_7+P_7+S_8+P_8$ (non-myosins, %)	27.5	22.4	17.6	13.0	14.0	—
	S_7 (myoalbumin, %)	3.1	5.0	2.5	2.5	2.1	—
	P_7 (myogen, %)	9.2	2.3	0.5	9.8	3.6	—
	S_8 (myosins ?, %)	0.1	0.3	0.1	0.1	0.6	—
	P_8 (globulin X, %)	15.1	14.7	14.5	0.6	7.7	—
	$P_5+S_2+S_3+S_4$ (total myosins, %)	**68.4** (**76.9**)***	**63.6** (**71.6**)***	**79.1**	**81.1**	**85.1**	—
Muscle	pH of muscle	6.3	6.4	6.3	6.4	6.8	6.4
	Total-N (%)	3.18	3.19	3.46	3.53	3.80	3.57
	Total proteins (%)	14.29	14.11	15.08	15.47	16.57	15.03
	$\frac{\text{Protein-N}}{\text{Total N}} \times 100$	71.7	70.7	70.5	70.3	72.8	67.5
Animal	Freshness	Good	Passable	Good	Excellent	Excellent	Good
	Sex	♂	♀	♀	♂	♂	♀
	Body weight (g.)	500	340	420	430	286	800
	Date	Dec. 3	Dec. 10	Dec. 18	Sept. 16	Oct. 14	Aug. 8

Note: * Determined after separating myosins.
** Nine m*l*. of extractant per every 1 g. muscle was used.
*** The figures in parenthesis were derived from correction of DYER *et al.* for myosins remaining in supernatant.



such as myosin and actomyosin, a salting-in curve study was tried on some preparations. The curves in Fig. 2 show that the greater part of each preparation are composed of globulins. Different from the translucent pasty appearance of precipitate of myosins, precipitates P_7 and P_8 appeared rather opaque and less lyophilic.

Fig. 2. Salting-in curves of myosins. Protein concentration: Ia, 0.22 mg./m*l*.; Ib, 0.22 mg./m*l*.; IIa, 0.27 mg./m*l*.

Discussion

As regards the data in Table 1, followings are apparent.

By both the methods employed, about 90% of the total muscle proteins of squid is dissolved by the first extraction, which is a similar level to the case with cod muscle reported by DYER *et al.*[3] Among the values of the residual protein of the last extraction (P_4) which might correspond to the stroma proteins in squid muscle, the values of IIb, IIc and IId should be most reliable, because they are completely freed from skin proteins. Thus the real content of the stroma proteins will be 2~3% of the total muscle proteins. With the amounts of other fractions, the error introduced from the contamination with the skin proteins appears to be negligibly small (~2% in relative value).

Myosins in extract S_1 are 58.6~78.4% and non-myosins, 12.5~31.9%. On the other hand, KITABAYASHI[10] has reported that muscle of squid, *Ommastrephes*, contains only 9% myosins and non-myosins as much as 82%. However, Fig. 2 shows that the best part of the precipitate regarded as myosins by the author is composed of some globulin if not myosin in a strict meaning so that the author's data on myosins and non-myosins seem to be supported.

If the proteins extracted into second and later extracts were, according to DYER's principle, assumed also as myosins, the value, S_1-P_5, might indicate the total non-myosins in the muscle, and also the value, $P_5+S_2+S_3+S_4=100-\{(S_1-P_5)+P_4\}$, might correspond to the total myosins. Though, in the present study, all non-myosins in the muscle were assumed to have been extracted into the first extract, it is probable that non-myosins which are the most soluble among the muscle proteins were brought exclusively into the first extract into which some 90% of the muscle proteins was brought in.

Among the data of non-myosins in Table 1, the values of Ia and Ib should be put out of consideration, because in these cases squid myosins might be confused into non-myosins as a result of high pH and high ionic strength of DYER's extractant as stated above. Thus, the content of non-myosins in squid muscle is inferred to be 12.5~18.6% of total muscle proteins. If the data of Ia and Ib are corrected for the unprecipitated myosins in DYER's way, non-myosins of these cases approach the values of Ic~IIc.

If reliable data are selected from a large number of the author's preliminary analysis in which extraction was done not repeatedly, non-myosins of the squid amount to, 12.1, 14.0, 15.0, 15.5 and 19.7%, which is a similar pattern to the present data.

Now, as a general picture, non-myosins in squid muscle might range from 12 to 20%, and so, myosins, from 77 to 85% of the total muscle proteins.

With the fractionation data of non-myosins, variation among 5 analyses is not small. Of the experimental conditions, the rates of dialysis might not be equalized. However, the electric conductivity of the sample solution after dialysis was 0.00015, 0.00012,

0.00021, 0.00015 mho for respective analyses. These values appear to be in a good agreement with one another and to be close to the precipitating condition of globulin X (10^{-4} mho). The variation of non-myosins in Table 1 might reflect the variation in physiological conditions of the used sample muscle, or it might be attributable to the inadequacy of this classification and fractionation method of the component proteins of non-myosins as suggested by HAMOIR[11] on the basis of his electrophoretic study. In the present paper, the patterns of distribution of myogen, myoalbumin and globulin X that constitute non-myosins will not be discussed.

With the curves in Fig. 2, the increment of solubility was found to occur in two steps. This might be due to that free myosin was dissolved between $I=0.05\sim0.15$ and actomyosin between $I=0.25\sim0.4$, though further study is needed for confirmation.

At any rate, the present study will present an information of the amount of 3 fractions, myosins, non-myosins, and stroma. In Table 2, the distribution pattern of

Table 2. Composition of muscle proteins of various animals

Animal	Author	Non-myosins (sarcoplasmic)	Myosins (fibrillar)	Stroma
Squid	The present author	12～20	77～85*	2～3
	KITABAYASHI[10]	82	9	5
Rabbit (white muscle)	WEBER *et al.*[1]	44	39	17
	SMITH[2]	27	57	16
	HASSELBACH *et al.*[12]	28	55～57	15～17
Chick (1 month)	ROBINSON[13]	33	62	5
Cod	DYER *et al.*[3]	21	76	3
Haddock	REAY *et al.*[14]	18	79	3
Torpedo	BAILEY[15]	18～28	65～71	7～12

For further data see HAMOIR[16].

* The properties of myosins are distinct in many points from those of myosins of fishes and rabbit.

squid muscle proteins is compared with those of various animals. Since reliability of the present data is proved by Fig. 2, it will be allowed to put aside the result of KITABAYASHI[10].

Although it should be noted that properties of each protein component of squid are distinct in many points from those of fishes as reported by the present author[4)5)9)17], and also that a different fractionation scheme might lead to differentiation of squid from fishes, squid appears to resemble fishes in the gross distribution pattern of muscle proteins; in both the animals, stroma is smaller in amount while myosins are greater as compared with the case of rabbit. With non-myosins, any significant difference is hardly found although rabbit might be superior to squid and fishes in amount of non-myosins.

Summary

1) The distribution pattern of squid muscle proteins was studied by the method of Dyer *et al.* as well as by a similar method which was modified in some points so as to fit the properties of squid muscle proteins.

2) Squid muscle proteins were found to consist of 12～20% of non-myosins, 77～85% of myosins and 2～3% of stroma. Subdivision of non-myosins into myogen, myoalbumin and globulin X did not give a uniform pattern from analysis to analysis. As far as the gross distribution pattern of muscle proteins is concerned, squid seems to resemble fishes, although properties of its myosins are distinct from those of fishes as shown in the previous reports.

The author wishes to express his gratitude to Dr. M. Migita for his advice, to Prof. S. Mizushima for his encouragement, and to Miss M. Akiba and Miss E. Okuyama for their technical assistance, and to Dr. H. Hirano for reading over the manuscript.

References

1) Weber, H. H. and Meyer, K.: *Biochem. Z.*, **266**, 137～152 (1933).
2) Smith, E. C. Bate-: *Proc. Roy. Soc. (London)*, **B 124**, 136～150 (1937).
3) Dyer, W. J., French, H. V. and Snow, J. M.: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **7**, 585～593 (1950).
4) Matsumoto, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 127～134 (1958).
5) Migita, M., Matsumoto, J. J., Aoe, N. ana Saishu, T.: *Ibid.*, **24**, 51～58 (1958).
6) Migita, M. and Matsumoto J. J.: *Ibid.*, **22**, 561～568 (1957).
7) Matsumoto, J. J. and Kanamitsu, T.: *Ibid.*, **21**, 284～288 (1955).
8) Migita, M. and Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **22**, 433～439 (1956).
9) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **23**, 92～104 (1957)
10) Kitabayashi, K.: *Bull. Hokkaido Regional Fish. Res. Lab.*, No. 11, 102～104 (1954).
11) Hamoir, G.: "Biochemistry of Fish", Cambridge Univ. Press., (1951) pp. 8～27.
12) Hasselbach, W. and Schneider, G.: *Biochem. Z.*, **321**, 462～475 (1951).
13) Robinson, D. S.: *Biochem. J.*, **52**, 621～628 (1952).
14) Reay, G. A. and Kuchel, C. C.: *Rept. Food Inv.Bd. Gr. Brit.*, (1936) 93～95.
15) Bailey, K.: *Biochem. J.*, **33**, 255～263 (1939).
16) Hamoir, G.: Advances in Protein Chemistry, **10**, 227～288 (1955).
17) Migita, M. and Matsumoto, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 641～652 (1954).

The Effect of ATP on the Viscosity of Squid Actomyosin

Juichiro J. Matsumoto
(*Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*)

Previously, a protein fraction containing an actomyosin or an actomyosin-like protein was isolated from the salt extract of squid muscle.[1] Although the similarity of the protein to rabbit actomyosin was suggested as far as the high viscosity, the intense streaming birefringence (SB), and the salting-in range were concerned, further evidences are awaited for identification. The most prominent characteristic of the actomyosin which is the dominant contractile protein of the rabbit muscle is that it shows the responses in its physical states to the addition of adenosinetriphosphate (ATP). For instance, the high viscosity of actomyosin solution in 0.5~0.6 M KCl is caused to fall rapidly by ATP and after a while, recovers gradually.[2)3)4)] Mommaerts has divided this process into "the viscosity response" (initial drop) as well as "the recovery effect", and the intermediate stage of low viscosity lying between these two stages has been called "the splitting time" by Csapó. Along with the change in viscosity, the changes in SB, and light scattering are observed during the response to ATP.[5)] Current idea concerning the mechanism of these changes is as follows:

In the initial drop of viscosity (viscosity response), shift from left to right in Equation 1 occurs.

$$\text{actomyosin} \underset{\longleftarrow}{\overset{+\text{ATP}}{\longrightarrow}} \text{actin} + \text{myosin} \qquad (1)$$

Then ATP is decomposed enzymatically by ATPase of myosin or actomyosin (splitting time).

$$\text{ATP} \xrightarrow{\text{myosin or actomyosin (ATPase)}} \text{ADP} + \text{P} \qquad (2)$$

When the quantity of ATP is reduced down beneath a definite level, shift from right to left in Equation 1 takes place (recovery effect). As far as reported in literatures, actomyosin of striated muscles and actotropomyosin of uterus unstriated muscle[6)] show such response with regard to the effect of ATP, while isolated preparation of either myosin, actin or tropomyosin does not. Therefore, the presence of the response would prove the possibility of the existence of an actomyosin or an actomyosin-like

Received May 14, 1958.
Contribution B No. 287 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo.
Read before the Annual Meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries, April 3, 1957.

protein such as, for example, actotropomyosin, in the tested preparation.

The present paper deals with some aspects of the response to ATP of the viscosity of the actomyosin preparation obtained by the procedure reported in the last paper.[1]

Experimental

Methods

Unless otherwise stated, methods employed are the same with the previous reports.[1][7][8] To exclude the injurious effect of heavy metal ions on the ATPase activity, glass redistilled water was used in all experiments.

Material: Mantle muscle was taken from common squids, *Ommastrephes sloani pacificus* Steenstrup, of either male or female (body weight 270~510 g.) which were caught from November to February.

Extraction and preparation: A procedure fitting the properties of squid protein as reported previously[1] was followed. To 30~50 g. of minced muscle, 0.6 M KCl of 5~9 times of its amount (m*l*./g.) was added, homogenized for 1 min., in a baffle-plated Waring blendor[9] and centrifuged for 20 min. at 4,000 r.p.m. (1,500~2,800 *g*). To the viscous supernatant 2 volumes of water were added dropwise, hereby the protein is precipitated 3 times at 0.2 M KCl. The last precipitate is dissolved into 0.5 M KCl solution by adding 2.4 M KCl, resulting in a very opaque and intensely streaming birefringent solution (pH 6.3~6.9, protein concentration 5.7~10.3 mg./m*l*.) in which 41~49% of total muscle proteins were present. Besides the solution was highly viscous, it gave rise, on standing, to a thixotropic gel. Since the greater part of the treatment was done in a cold room (0~4°C.), the liquid temperature did not exceed 10°C. even immediately after centrifugation.

Viscosity: Measurement were done at 20°C. by either of two viscometers used in the previous study.[10] The time of outflow of the viscometers for 5 m*l*. of 0.5 M KCl were 12.7 sec. and 14.6 sec. respectively and the capillary diameter was 0.7 mm. After keeping the protein solution in the thermostat for 5~10 min., 0.05 m*l*. of 0.5 M KCl solution with or without added $CaCl_2$ or $MgCl_2$ was added, and then 0.1 m*l*. of ATP solution was added and the change of viscosity was followed.

ATP: ATP-K_2 salt of Zellstofffabrik was dissolved in 0.5 M KCl and neutralized to pH 6.0. The concentration of the used solution was 43.8 mg./m*l*. (7.5×10^{-2}M). The test of purity was omitted.

Results

(A) Effect of ATP

When ATP was added to the actomyosin preparations of squid of various concentrations, the viscosity changed as shown in Fig. 1. So, the viscous component of

the actomyosin preparation of squid proved itself to show, on the addition of ATP, the viscosity response and the recovery effect as actomyosins of rabbit and carp do. Therefore, also in the case of the squid actomyosin preparation, a process similar to that of Equations 1 and 2, *i.e.*, dissociation of actomyosin, action of ATPase, and recombination of actomyosin, or some similar processes if not identical, might have occurred. However, it should be noted that the decreased viscosity after ATP addition was recovered so rapidly that the stage which should be referred to as the splitting time was not found. If the extent of the viscosity drop was revealed in terms of ATP-sensitivity of WEBER *et al.*,[5)11)] the values ranged from 46 to 84% as shown in Table 1. ATP-sensitivity appeared to decrease with the decrease in protein concentration. The values at higher protein concentrations were slightly lower than but comparable with those of rabbit

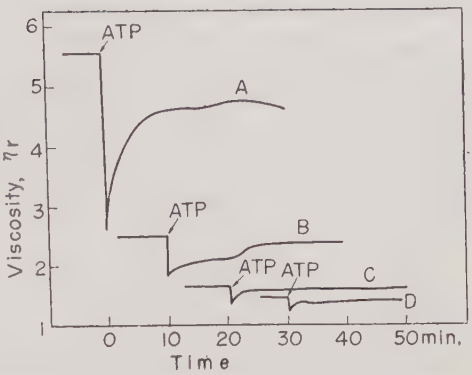


Fig. 1. Changes of viscosity of squid actomyosin preparation upon added ATP.
KCl, 0.5 M; pH~6.9; 20°C.
For other conditions see Table 1.

Table 1. Changes of the effect of ATP on the viscosity of squid actomyosin preparation of various concentrations during cold storage

No.	Protein concentration (mg./ml.)	Time after dissolution (hr.)	Relative viscosity			Viscosity number (Z_η) at η_0	ATP-sensitivity* (%)	Extent of recovery** (%)
			Before adding ATP η_0	After adding ATP η_{ATP}	After recovery η_1			
IA	10.0	24.5	5.56	2.56	4.65	0.17	84	76
IB	6.69	21.5	2.52	1.77	2.30	0.14	62	74
IC	5.00	25.5	1.67	1.41	1.62	0.10	46	82
ID	3.35	21.0	1.47	1.28	1.39	0.12	56	70
IIA	10.0	45	3.48	1.87	2.98	0.13	100	75
IIB	6.69	43	1.89	1.49	1.86	0.10	60	94
IIIA	10.0	72	2.26	1.76	1.94	0.08	44	65
IIIB	6.69	70	1.59	1.39	1.51	0.07	44	64
IVA	10.0	91	1.99	1.70	1.80	0.07	30	36
IVB	6.69	96	1.49	1.40	1.43	0.06	18	34

* $\frac{\ln \eta_0 - \ln \eta_{ATP}}{\ln \eta_{ATP}} \times 100$, ** $\frac{\ln \eta_1 - \ln \eta_{ATP}}{\ln \eta_0 - \ln \eta_{ATP}} \times 100$.

actomyosin (60～180%), or carp actomyosin (～116%).[11)12)]

The once-fallen viscosity recovered sooner but the recovered value did not reach the level observed before the addition of ATP. If a function, $(\ln \eta_1 - \ln \eta_{ATP})/(\ln \eta_0 - \ln \eta_{ATP}) \times 100$ (η_0, η_{ATP}, η_1; the relative viscosity values before and after adding ATP and the value after recovery respectively) was calculated to compare the extent of recovery, results were as shown in Table 1, wherein the value ranged from 70 to 82%.

The amount of ATP used in this experiment was 7.5～19 g. moles per 10^5 g. protein.

(B) Change of the ATP-response during the cold storage of protein solution

As reported in the previous paper,[1)] the actomyosin of squid is less stable than actomyosins of rabbit and carp, and changes its solubility behavior during the cold storage. Therefore, the effect of storage of the solution on the response to ATP was examined. As Table 1 shows, the viscosity of the actomyosin preparation decreased day by day, the ATP-sensitivity as well as the extent of recovery appearing to fall simultaneously.

(C) Effect of Ca and Mg ions

The ATPase activity of rabbit actomyosin has been known to be promoted by Ca ion and inhibited by Mg ion in the presence of ～0.5 M KCl.[2)13)14)] Thus, response to ATP of the viscosity of squid actomyosin preparation was studied at 0.001～0.01 M of Ca or Mg ion concentration, because the promoting or inhibiting effect of the respective ions on the rabbit actomyosin ATPase is most marked at these concentrations. Fig. 2 and Table 2 were obtained. In this case, the precipitated actomyosin was washed 2 times with 0.05 M KCl[15)16)] after the preparative procedure described above, in order to avoid the contamination with the water-soluble Mg-activated ATPase.[2)13)]

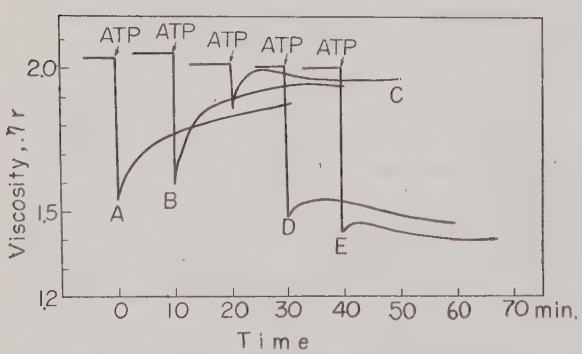


Fig. 2. Effect of bivalent ions on the ATP-response of viscosity of actomyosin preparation of squid.
KCl, 0.5 M; pH～6.3; 20°C.
For other conditions see Table 2.

In the presence of Ca ion (Curves B and C), the ATP-sensitivity was lower and the extent of recovery was higher compared with the control (Curve A). These effects were more marked in the higher concentration of Ca ion.

In the presence of Mg ion (Curves D and E), the once-fallen viscosity appeared to recover slightly, but, no sooner, the recovery stopped and then the viscosity tend-

Table 2. A quantitative aspect of Fig. 2.

Curve	Protein concentration (mg./ml.)	Synergist	Relative viscosity			Viscosity number (Z_η) at η_0	ATP-sensitivity (%)	Extent of recovery (%)
			Before adding ATP η_0	After adding ATP η_{ATP}	After recovery η_1			
A	6.32	——	2.04	1.52	1.86	0.13	70	77*
B	6.32	0.001 M $CaCl_2$	2.05	1.57	1.93	0.14	56	84
C	6.32	0.01 M $CaCl_2$	2.01	1.84	1.99	0.13	14	84**
D	6.32	0.001 M $MgCl_2$	2.00	1.48	1.54	0.13	100	13**
E	6.32	0.01 M $MgCl_2$	2.00	1.43	1.46	0.13	95	9**

* The maximum value 30 min. after the addition of ATP was deemed as η_1.
** The maximum value on the recovery curves were deemed as η_1.

ed to decrease slowly. The ATP-sensitivity of these cases was larger and the extent of recovery was by far smaller than that of the control (Curve A). Also in the presence of 0.01 M Ca ion, the slow decrease of the once-recovered viscosity was shown.

The effect of Ca and Mg ions will be discussed later. The quantity of ATP used in these experiments was 16.3 g. moles per 10^6 g. protein.

Discussion

The present results show that the viscosity of the actomyosin preparation of squid obtained by the method of the previous report responds in 0.5 M KCl to ATP in a simillar manner to rabbit actomyosin. The viscosity response as well as recovery effect according to MOMMAERTS' notation[3)4)] were found. Therefore, it is thought that this preparation might contain a complex protein which undergoes a dissociation by ATP, breaks down the ATP by its own ATPase activity and then recombines into the complex protein.

Nevertheless, there is a few points which deserve to one's attention.

In the most cases of the rabbit actomyosin, a state of low viscosity which succeeds the addition of ATP lasted for a duration so that it was referred to as "the splitting time". In the present results, with squid actomyosin preparation, the recovery of viscosity was so rapid that a stage corresponding to the splitting time was not significant. If the ATPase activity of squid actomyosin is high, it may be responsible for such difference. But as far as the ATPase activity estimated from liberation of inorganic phosphate is concerned, the activity of squid myosin is not very high.[17)18)]

Though the splitting time was absent in few cases of the experiments with rabbit actomyosin[3)19)], with uterus muscle protein[4)] and with myosin B of *Pecten*[20)], in the case of squid actomyosin, its absence appears rather consistent. Hence this fact might be related to a characteristic of squid actomyosin.

The effect of Ca and Mg ions on the recovery effect seems to be in opposite sides with each other. According to the MOMMAERTS' point of view, the results of Fig. 2 and Table 2 might lead to a proposition that the ATPase activity of the squid actomyosin is, at 0.5 ionic strength, promoted by Ca ion of 0.001～0.01 M and inhibited by Mg ion of 0.001～0.01 M. However, since the difference among the recovery slopes of Curves A, B and C are insignificant, the effect of Ca ion is not apparent. With the effect of Mg ion (Curves D and E), an increasing stage with a comparable slope with Curves A～C is found for a short time immediately after the fall by ATP, although the extent of recovery is markedly depressed. Hence these results with regard to Ca or Mg ion might have been attributable not to the effect on ATPase activity but to some unknown factors. At any rate, it is apparent that the recovery effect was promoted with Ca ion while it was depressed with Mg ion.

As shown in Table 2, the ATP-sensitivity (viscosity response) appears to have been depressed with Ca ion, but enhanced with Mg ion.

This fact may be in accordance with MOMMAERTS' suggestion from experiments on rabbit actomyosin[3] which was confirmed by the light scattering study of YAGI *et al.*[21] on *Pecten* myosin B.

In Curves C, D and E of Fig. 2, the once-recovered viscosity tended to fall. Though the reason remains obscure, it seems that the system is affected by a Ca or Mg ion. Such behavior might be another characteristic of squid actomyosin.

In Table 1, it is apparent that the viscosity, the ATP-sensitivity as well as the extent of recovery fell during the storage of the solution. This fact will be explained in the following way. If the viscous complex protein tends to dissociate into less viscous components, the amount of the complex may decrease gradually, which results in the fall in ATP-sensitivity. On the other hand, if the component proteins tend to lose the recombinating capacity, it may lead to the decrease in the extent of recovery.

These changes in the viscosity, the ATP-sensitivity and the extent of recovery appear to run parallel with the finding of the previous work[1], that the component which is less soluble at lower ionic strengths decreases in amount during storage of the solution. Therefore, this component appears to be responsible for the high viscosity, and for the response of viscosity to added ATP of the actomyosin preparation of squid.

The viscosity number of the squid actomyosin preparations which is shown in Tables 1 and 2 seemes lower compared with those of actomyosins of rabbit (0.3～0.5)[6][11] and of carp (0.50～0.54)[12]. However, since the viscosity number of the squid actomyosin preparation was variable from sample to sample and since the viscosity number of each sample decreased with time after dissolution, further study is needed for this point.

At any rate it is most probable that the present preparation contains a homolo-

gue of the contractile muscle proteins, though it is distinct from rabbit and carp actomyosin in detailed properties.

The present author has been found previously, that repeated extractions of squid muscle with water give rise to dissolving out of an asymmetric protein which should be contained in the myosin fraction of the salt extract.[7] From experimental bases, this protein was presumed to be an actomyosin-like protein which is distinct from so-called actomyosin in some properties such as the solubility in water, being referred to as M-actomyosin.[8] Also in M-actomyosin, the addition of ATP produced viscosity drop, succeeded by a recovery effect which is inhibited by Mg ion and promoted by Ca ion.[10] It would be interesting that, both with the present actomyosin preparation and with M-actomyosin, the once-recovered viscosity fell again if either Ca or Mg ion was present. That the salting-in behavior is apt to become less precipitable during storage, would be another characteristic shared by these two proteins.[1)22)]

Therefore, it seems likely that M-actomyosin from aqueous extract of squid is identical with the actomyosin preparation from salt-extract, though further confirmation is needed for the conclusion.

Summary

1) The actomyosin preparation of squid muscle obtained with a procedure of the previous report showed, upon the addition of ATP, a viscosity change which is similar to the case with rabbit actomyosin. The viscosity fell quickly after adding ATP (viscosity response), a gradual recovery succeeding it (recovery effect). But the so-called splitting time was not found in the case of squid protein. The values of the ATP-sensitivity were of a level comparable with rabbit actomyosin.

2) If the protein solution was stored in the cold, the viscosity and the ATP-sensitivity were found to decrease.

3) The recovery effect was promoted by 0.001～0.01 M Ca ion, and inhibited by Mg ion of the same concentration.

4) It appeared that the ATP-sensitivity was depressed by Ca ion while it was enhanced by Mg ion.

5) The once-recovered viscosity was found to decrease again, if either Ca ion or Mg ion was present.

6) Probably the actomyosin preparation of squid might contain a homologue of the contractile muscle proteins, though it is not identical with actomyosin of rabbit and carp in detailed properties.

7) From comparison of actomyosin preparation with M-actomyosin obtained from aqueous extracts of squid, the identity of these proteins was suggested as far as the response to ATP and the salting-in behaviors are concerned.

The author wishes to express his gratitude to Dr. M. MIGITA for his valuable advise, to Prof. S. MIZUSHIMA and Prof. T. ANDO for their encouragement and to Miss M. AKIBA for her technical assistance.

References

1) MATSUMOTO, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 125~132 (1958).
2) ENGELHARDT, V. A.: Advances in Enzymology, **6**, 147~191 (1947).
3) MOMMAERTS, W. F. H. M.: *J. Gen. Physiol.*, **31**, 361~375 (1948).
4) CSAPÓ, A.: *Nature*, **164**, 702~703 (1949).
5) WEBER, H. H. and PORTZEHL, H.: Advances in Protoin Chemistry, **7**, 161~247 (1952).
6) SNELLMAN, O. and TENOW, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 199~208 (1954).
7) MIGITA, M. and MATSUMOTO, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 641~652 (1954).
8) MATSUMOTO, J. J.: *Ibid.*, **23**, 92~104 (1957).
9) MIGITA, M. and MATSUMOTO, J. J.: *Ibid.*, **22**, 561~568 (1957).
10) MATSUMOTO, J. J.: *Ibid.*, **23**, 775~781 (1958).
11) PORTZEHL, H., SCHRAMM, G., and WEBER, H. H.: *Z. Naturforsch.*, **5b**, 61~78 (1950).
12) HAMOIR, G.: *Arch. intern. phsiol. et biochem.*, **63**, suppl. (1955).
13) BAILEY, K.: "The Proteins" Vol. 2, Part B. Academic Press, New York (1954) 951~1055.
14) WATANABE, S., TONOMURA, Y. and SHIOKAWA, H.: *J. Biochem.* (*Jap.*), **40**, 387~402 (1953).
15) MIYAZAKI, R., TERAYAMA, Y. and YUTAZAKA, Y.: *Sapporo Med., J.*, **5**, 209~212 (1952).
16) WATANABE, S.: "Standard Methods of Biochemistry", Edited by AKABORI, S. *et al.*, Bunkyudo, Tokyo, 1953, p. 245.
17) DE VILLAFRANCA, G.: *Biol. Bull.*, **108**, 113~119 (1955).
18) MATSUMOTO, J. J.: Unpublished data.
19) DAINTY, M., KLEINZELLER, A., LAWRENCE, A. S. C., MIALL, M., NEEDHAM, J., NEEDHAM, D. M., and SHEN, S. C.: *J. Gen. Physiol.*, **27**, 355 (1944).
20) TONOMURA, Y., YAGI, K., and MATSUMIYA, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **64**, 466~479 (1956).
21) YAGI, K.: *J. Biochem.* (*Jap.*), **44**, 337~345 (1957).
22) MATSUMOTO, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 29~36 (1958).

蛋白と色素との結合に及ぼす尿素の影響

右田正男・大竹茂夫
(東海区水産研究所)

Influence of Urea upon the Binding of Some Ionic Dyes to Proteins

Masao Migita and Shigeo Otake

By using equilibrium dialysis method, it was intended (i) to ascertain the findings obtained spectrophotometrically by Klotz et al. that urea not only inhibits the interaction between serum albumin and methyl orange (MO), but also splits the preformed combination between them, and (ii) to examine the influence of urea upon the binding of MO and methylene blue (MB) to fish "actomyosins".

Equilibrium dialysis

5 m*l*. of protein solution in inside cell was dialysed against 10 m*l*. of dye solution in outside cell through cellophane for 72 hr. at 4°C.* Control dialysis was set up in order to make correction for absorption of dye on membrane itself. Amount of bound dye was calculated from the difference between equilibrium concentrations of free dye in ouside cells of protein-containing and control dialysis systems.

Results

1. In 6 M urea, combination between serum albumin and MO did not take place (Table 2), and also the preformed combination was abolished (Table 4). Binding of MO to cellophane which was used as semipermeable membrane was also completely inhibited in 6 M urea but the binding once formed was hardly affected.

2. In 2 M urea, the binding of MO to albumin took place to some extent though an inhibitory effect of urea was marked. The extent of combination was the same whether albumin and MO were dialysed in 2 M urea solution, or albumin in 6 M urea was dialysed against 3 vol. of phosphate buffer containing MO (Table 2, and Fig. 1, Curve C).

3. 0.6 M malonic amide and 1M urea are equivalent in raising dielectric constant of water. The former, however, inhibited only slightly the binding of MO to albumin, but the latter noticeably. Thus the inhibitory effect of urea cannot be explained soley by increase in dielectric constant of the solution.

4. "Actomyosin" either from horse mackerel or squid combined with both MO and MB but albumins do not combine with MB. Under the conditions of the present experiments there seemed to exist the following orders with regard to the combining abilities of dye and of "actomyosin": MB > MO, and squid "actomyosin" > horse mackerel "actomyosin".

5. Carp "actomyosin" which was freed from urea by dialysis after it had been kept dissolved in 6 M urea for 24 hr., showed the same binding ability toward MO as native carp "actomyosin". Results 2 and 5 show that effect of urea upon the combination of protein and MO is reversible.

* For the apparatus, see this Bull. **22**, 260 (1956).

緒　　言

われわれは前報[1]において，魚介肉"アクトミオシン"(0.5 M KCl により抽出され，10 倍稀釈により沈澱される筋肉蛋白の区分) と有機色素の結合量の測定を行うことによつて，魚介肉蛋白質の変性現象を追求し

1958 年 8 月 13 日受理　東海区水産研究所業績B第 291 号

うることを明かにした。その際魚介肉“アクトミオシン”とメチルオレンジ（以下 MO と略す）との結合は，尿素の 1 M 又は 3 M 溶液中では，燐酸塩緩衝液中における場合に比し著しく減少し，6 M-尿素中では殆んど結合しないことを観察した。なお血清アルブミンと MO との結合に及ぼす尿素の影響について KLOTZ 等[2]は，蛋白と尿素の混合物に色素を加えた系と，蛋白と色素とを混合して 24 時間後尿素を加えた系の吸光係数を比較して，尿素は単に蛋白と MO との結合を妨げるばかりでなく，色素が既に結合している場合でも，これを追出し，尿素自身がアルブミンと結合するといつている。ところで MO はイオン性のものであり，尿素は極性化合物であるから，MO と蛋白との間の既成の結合が尿素によつて破られるということは，色素と蛋白の結合機構及び蛋白の尿素変性機構に関連して興味のある事実と思われる。

そこでわれわれは魚介肉の構造蛋白についても同じようなことがいえるかどうかを知ろうとした。但しこの場合測定方法として KLOTZ 等[2]の用いた吸光曲線による方法の適当でない恐れがある。魚介肉の構造蛋白の場合は，魚種或いは蛋白濃度その他の条件によつて，蛋白—色素混合系における吸収が純色素溶液がボす吸収よりも高くなることがあるからである*。よつて平衡透析法により，アルブミンについての KLOTZ 等の実験結果を追試すると共に，魚介肉の構造蛋白と色素との結合に対する尿素の影響をしらべた。この際色素としては MO の外メチレン青（以下 MB と略す）をも試みた。魚介肉蛋白は前に報告したように[1]アルブミンと異なり，負荷電をもつた MO ばかりでなく，正荷電をもつた MB とも結合するからである。なお尿素がアルブミンと MO との結合に及ぼす作用と，尿素が水の透電恒数を増す作用との間には関連があるかどうかについても実験を行つた。

実　験　法

試　料

（i） 血清アルブミン　シューリング製（結晶）をそのまま用いて種々の溶液を作つた。この分子量を 67,500 とみなした。

（ii） 魚介肉“アクトミオシン”　マアジ，スルメイカ，コイより前報と同様に抽出した。即ち筋肉を細砕し，肉重量の 10 倍容量の氷冷塩溶液（0.5 M, KCl+0.03 M, $KHCO_3$ pH 7.4）を加え，ブレンダーにかけ，遠心分離後上澄液を氷冷蒸溜水で 10 倍に稀釈し，再び分離，沈澱を燐酸塩緩衝液（0.36 M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$+0.06 M KH_2PO_4 pH 7.4）に溶解し，遠心分離して不溶解部分を除去して“アクトミオシン”試料とした。試料魚のマアジ及びスルメイカは東京中央魚市場で手に入れたもので実験の前夜漁獲された近海物を用い，コイは活魚を用いた。

（iii） その他　MO は国産の特級品を再結晶し，MB はメルク製（化学用）をそのまま用いた。

マロン酸アミド $\left(CH_2<\begin{matrix}CONH_2\\CONH_2\end{matrix}\right)$ はマロン酸エチルエステルとアンモニア水を封管内で加熱[3]して作つた（m. p. 168～170°C）。

結合量の測定法

前報に報告した透析内器（沪斗形ガラス器にセロファン膜をパラフィンと糸を用いてはりつけたもの）に 5 ml の試料をいれ，これを 10 ml の色素溶液をいれた透析外器（円筒硝子管）中に浸し，外器に密栓して 4°C に 2 昼夜静置して平衡に達せしめ，外液の色素濃度をベックマン DU 型分光々電光度計で測り（測定波長 MO 465 mμ, MB 665 mμ）．これを A M(モル)とする。一方透析内器中に蛋白を含まず，他は全く同一条件のものを対照としてとり，平衡達成後の外器中の色素濃度を A_0 M とすると，蛋白の結合した色素は $(A_0-A)\times15\times10^{-3}$ gram M となる。蛋白溶液の濃度を p M とすると，蛋白 1 gram M 当りの結合量は $(A_0-A)\times15\times10^{-3}/p\times5\times10^{-3}=(A_0-A)\times3/p$ gram M である。但し“アクトミオシン”の場合は蛋白窒素 1 mg 当りの結合量を示した。

---

* 昭和 31 年度水産学会春期大会講演

結果及び考察

実験 I　血清アルブミンと MO の結合に及ぼす尿素の影響

a.　燐酸塩緩衝液中における血清アルブミンと MO の結合

蛋白濃度 3.94×10^{-5} M, 色素濃度 20.0×10^{-5} M, pH 7.4 におけるアルブミンの色素結合量 r (=Bound dye (M)/Protein (M)) を求め, Table 1 に示す結果を得た。この値は KLOTZ 等の得た遊離色素量—結合量 (r) の曲線 (Fig. 1* のA曲線) 上に大体のつている。

Table 1. Binding of methyl orange to serum albuminin phosphate buffer (pH 7.4)

		Exp. 1	Exp. 2
Concn. of albumin (M)		3.94×10^{-5}	3.94×10^{-5}
Original concn. of dye (M)		20.0×10^{-5}	20.0×10^{-5}
Equilibrium concn. of free dye (M)	Control (A_0)	8.99×10^{-5}	9.13×10^{-5}
	Sample (A)	6.42×10^{-5}	6.71×10^{-5}
Bound dye (gram M) $(A_0-A)\times15\times10^{-3}$		38.6×10^{-8}	36.3×10^{-8}
Bound dye (M)/Protein (M)		1.96	1.84
Dye fixed by membrane (gram M)		65×10^{-8}	63×10^{-8}

Table 2. Binding of methyl orange to serum albumin in 6 M urea solution (pH 7.4)

		Ex. 1	Exp. 2
Concn. of albumin (M)		3.55×10^{-5}	3.55×10^{-5}
Original concn. of dye (M)		5.00×10^{-5}	25.0×10^{-5}
Equilibrium concn. of free dye (M)	Control (A_0)	3.29×10^{-5}	16.97×10^{-5}
	Sample (A)	3.35×10^{-5}	16.85×10^{-5}
Bound dye (gram M) $(A_0-A)\times15\times10^{-3}$		-0.90×10^{-8}	1.8×10^{-8}
Bound dye (M)/Protein (M)		-0.05	0.10
Dye fixed by membrane (gram M)		0.6×10^{-8}	-4.5×10^{-8}

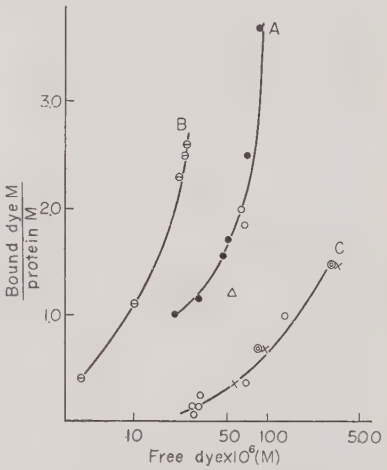


Fig. 1. Binding of methyl orange with serum albumin under various conditions.
Curve A. Combination in phosphate buffer solution.
● Values obtained by Klotz et al.
○ Values in Table 1.
Curve B. ⊖ In glycine solution.
△ In 0.6 M malonic amide solution.
Curve C. In the presence of 2 M urea.
○ In 2 M urea solution.
◎ In 2 M urea salution preceded by 6 M urea treatment.
× In 1 M urea salution.

セロファン膜に吸着された色素

対照実験において, 最初 10 ml の緩衝液中にとけていた色素が平衡達成後は 15 ml にうすめられるとして, 平衡達成後の色素濃度を計算すると 13.3×10^{-5} M となるが, 実測値は約 9×10^{-5} M である。このひらきは膜に色素が吸着されたためと考えられ, その量は 64×10^{-8} M (平均) となる。

b.　6 M 尿素溶液中におけるアルブミンと MO の結合

アルブミン及び MO を夫々 6 M の尿素に溶解し, 前者を透析内器に, 後者を外器中に入れ, 透析法によつてその結合量を求めた。結果は Table 2 に示すように, 色素は蛋白に結合されないものと考えられる。

* Fig. 1. は横軸に平衡達成後の遊離色素の濃度をとり, 縦軸にアルブミンモル当りの結合色素量 (r) を示したものである。

Table 3. Binding of methyl orange to serum albumin in 2 M urea solution (pH 7.4)

	Control	Sample
Concn. of albumin (M)		4.10×10^{-5}
Original concn. of MO (M)	20.0×10^{-5}	20.0×10^{-5}
Equilibrium concn. of free dye (M)	13.4×10^{-5}	12.2×10^{-5}
Bound dye (gram M) $(A_0-A)\times15\times10^{-3}$	18.0×10^{-8}	
Bound dye (M)/ Protein (M)	0.90	
Dye fixed by membrane (gram M)	-0.1×10^{-8}	

この場合はセロファン膜に対する色素の結合もまた認められない。

c. 2 M 尿素溶液中におけるアルブミンと MO との結合

内液にアルブミンの 2 M 尿素溶液，外液に MO の 2 M 尿素溶液をいれて透析平衡させた。その結果の一例を Table 3 に示し，またこのほかにくりかえし行つた実験結果を図示すると Fig. 1 の C 曲線のようになる。

即ち 2 M の尿素溶液中では，MO とアルブミンの結合はおこる。但し結合量は燐酸塩溶液中における 1/2 たらずである。セロファンに対する色素の結合はなお認められない。

なおアルブミンと MO とを 6 M 尿素中で透析平衡させた後，その透析内器（液量 5 m*l*）を MO の燐酸塩溶液（10 m*l*）中にうつし，再び透析平衡させて尿素の濃度を 2 M とした場合の MO の結合量（Fig. 1 の◎印）を求めたが，よく Fig. 1 の C 曲線上にのつている。即ち尿素の影響は可逆的であることがうかがえる。

d. アルブミン—MO 結合系に対する尿素（6 M）の影響

6 M 尿素溶液中ではアルブミンと MO は結合しえないことは実験 I. b に明かであるが，既に出来あがつたアルブミンと MO との結合はどうなるかをみるために次のような実験を行つた。

I a と同様にして燐酸塩緩衝液中でアルブミンと MO を結合させると，透析内器で 36.9×10^{-8} M の色素が蛋白と結合する（Table 4）。この透析内器をとり出し，外面に附着している色素溶液を沪紙でよくふきと

Table 4. Influence of urea (6 M) on the preformed combination between albumin and methyl orange

After serum albumin and MO were subjected to equilibrium dialysis against phosphate buffer, the inside cell with albumin solution was taken out from the outside cell and put into another containing MO dissolved in 9 M urea. The new system was again brougt to equilibrium by dialysis. Concentration of urea would become 6 M at equilibrium. Values in this table inform that 32.4×10^{-8} M out 36.9×10^{-8} M of MO which had been bound to alubnmin in phosphate buffer was set free in 6 M urea.

	In phosphate buffer (System I)		In 6 M urea soln. (System II)	
	Control (A_0)	Sample (A)	Control (A_0)	Sample (A)
Original concn. of MO in outside cell (M)	19.91×10^{-5}	19.91×10^{-5}	19.78×10^{-5}	19.78×10^{-5}
Concn. of albumin (M)		3.68×10^{-5}		3.68×10^{-5}
Equilibrium concn. of free dye (M)	9.16×10^{-5}	6.70×10^{-5}	16.56×10^{-5}	18.72×10^{-5}
Bound dye $(A_0-A)\times15\times10^{-3}$ (gram M)	36.9×10^{-8}		-32.4×10^{-8}	
Bound dye (M)/protein (M)	1.84			
Dye fixed by membrane (gram M)	61.8×10^{-8}		57.0×10^{-8}*	

* Total dye in System II = Dye brought from System I to II + Dye added into the outside cell of System II = $(61.8+9.16\times5)\times10^{-8}+197.8\times10^{-8}$ (M) = 305.4×10^{-8} (M).
If the dye is existing entirely in free state, equil. conc. of it will be 20.36×10^{-5} (M).
Dye fixed by membrane = $(20.36-16.56)\times15\times10^{-8}=57.0\times10^{-8}$ (M).

，別に用意した MO の 9 M 尿素溶液（色素濃度 $= 19.78\times10^{-5}$ M）10 ml を入れた外器中に浸す。しる後に平衡に達せしめると 10 ml の 9 M 尿素溶液は 15 ml にうすまるため，尿素の濃度は全体として M となる。

外液を単なる 9 M の尿素溶液とせず，特に MO を加えたのは，外液に MO がなければ尿素の作用をまたず，燐酸塩緩衝液中でも蛋白や膜から色素が落ちるからである。

なお対照として蛋白を含まぬ系について全く同様な操作を行う。

ここに注意すべきは，燐酸塩緩衝液中で蛋白と色素とを透析平衡させた系を系Ⅰ，その透析内器を色素の尿素溶液を含む外器中に浸した系を系Ⅱとすると，系Ⅱの対照とした系と，蛋白を含む系とで全色素量及び透析はじめの遊離色素量が同じでない*。即ち蛋白系の方が 2.46×10^{-7} gram M だけ全色素量は多く，透析はじめの遊離色素の量は逆に 1.23×10^{-7} gram M** だけ少いことである。従つて対照とした系は厳密な意味では対照といえないかも知れないが，系Ⅱの全色素量は 30×10^{-7} gram M の桁であるから，全色素量にみられる約 10 % の差は平衡後の系Ⅱの色素の配分に著しい影響はないとみてさしつかえない。従つて事実上対照とみて計算を行つた。

以上の実験から Table 4 に示すように，透析後の尿素濃度が 6 M になつた時の遊離色素の濃度は蛋白を含む系の方が対照におけるよりも 2.16×10^{-5} M だけ大きくなつている。しかるに透析前には対照系の方が遊離色素の濃度は大きかつた。従つてこの実験結果は蛋白系中の蛋白又はセロファン膜と結合した色素が脱落して溶液中に入つたことを示す。しかるにこの実験ではセロファン膜と結合している色素が尿素の存在によつてうける影響は，蛋白系においても対照系においても同じとみているから，2.16×10^{-5} M なる遊離色素の濃度の差は蛋白についていた色素の脱落によつて生じたものである。その量は 3.24×10^{-7} gram M である。しかるに系Ⅰで蛋白についていた色素は 3.69×10^{-7} M であるから，6 M の尿素中では予めアルブミンと結合していた色素が事実上全く離れてしまうといえる。

なおセロファン膜に結合した色素を計算すると，燐酸塩溶液中 6.18×10^{-7} gram M, 6 M 尿素中 5.70×10^{-7} gram M となり (Table 4)，セロファン膜に一度結合した色素は 6 M 尿素中に入れても殆んど脱落しないことがわかる。この事実は色素を初めから 6 M 尿素溶液中で透析すると色素は全くセロファンと結合しないことを示した実験Ⅰb の結果と比べると興味深い。即ち一度出来てしまうと，セロファンと MO との結合は 6 M 尿素に対して安全であるが，結合の形成は 6 M 尿素によつて妨げられる。

実験 II　グリシン及びマロン酸アミド溶液中におけるアルブミンと MO との結合

尿素水溶液は水に比較してその透電恒数が大きく，尿素 1 モルにつき水の透電恒数を 2.7 増大せしめる。かる系の透電恒数が増大すると，その系の中における静電気的引力は弱められる。一方アルブミンと MO との結合はイオン性のものが主体と考えられているので[4]，尿素が透電恒数を高めることも尿素がアルブミンと MO との結合を妨げることに関係ありそうに思える。但し 6 M 尿素中で静電的引力は水溶液中の約 8 余に落ちるにすぎない。従つてこれが決定的な効果を及ぼすとは考えられないが，効果の程度を知るため グリシン（透電恒数増加 22.6/M）及びマロン酸アミド（透電増加 4.3/M）溶液中におけるアルブミン MO の結合をしらべた。

. グリシンの影響

グリシンは水の透電恒数を著しく増大するものとして知られているが，KLOTZ[5] によると血清アルブミン MO 結合量はグリシン溶液中で最も大きく，かつ燐酸塩緩衝液中におけるアルブミンの MO 結合量はグシンを加えると増す。われわれは追試の意味で 0.7 M のグリシン溶液中における MO とアルブミンとの合量を MO のいろいろの濃度で測定し，KLOTZ 等と全く同様な結果を得た。即ち Fig. 1 の曲線Bに示

系Ⅰを系Ⅱに移した際，系Ⅰの外器中に残る色素量から計算。
蛋白系 $6.70\times10\times10^{-8}$ M，対照系 $9.16\times10\times10^{-8}$ M
系Ⅰの透析内器中の色素濃度から計算。
蛋白系 $6.70\times5\times10^{-8}=3.35\times10^{-7}$ M，対照系 $9.16\times5\times10^{-8}=4.58\times10^{-7}$ M

すように，0.7 M のグリシン水溶液は尿素の 6 M 溶液に相当する透電恒数を有するにかかわらず，MO に
アルブミンに対し燐酸塩溶液中におけるよりもはるかに大きい結合力を示している。即ちグリシンの場合透
電恒数が増加しても結合を弱める効果は現われなかつた。

b. マロン酸アミド $\left(CH_2<\begin{matrix}CONH_2\\CONH_2\end{matrix}\right)$ の影響

マロン酸アミドは 0.6 M 溶液を用いた。この透電恒数の増加は 2.6 で尿素 1M 溶液と同じである。MO
の結合量は $r=1.09$（平衡色素濃度 $\fallingdotseq 54\times10^{-7}$ M）で，Fig. 1 の曲線A（燐酸塩溶液中における結合量
の下方△で示す位置にあり，燐酸塩溶液中における結合量 $r\fallingdotseq 1.7$ に比べ有意の減少を示している。一方
これと同じ透電恒数増加を示す 1 M 尿素溶液中の結合量は甚だ少なく，Fig. 1 の×で示す位置にあり大体
曲線C（2 M 尿素溶液中における結合量）上にある。マロン酸アミドは溶解度が小さいので，これ以上の濃
度で実験を行うことはできなかつた。

これらのことを総合するとマロン酸アミド溶液中におけるアルブミンの MO 結合量の減少には透電恒数
増加の影響が与つていると思えないこともないが，尿素の場合には透電恒数増加の影響などは無視しうるよ
うな大きな原因が他にある。それは多分尿素の蛋白変性効果として知られている蛋白分子の形を著しくかえ
る作用であろう。またグリシンの場合には透電恒数の増加による結合量の減少を補つて余りあり，結合量を
増加させるような因子の存在が予想される。この因子はグリシンが両性イオンであることではないかと思わ
れるが，これについてはあらためて実験する予定である。

実験 III　魚介肉“アクトミオシン”と MO 及び MB との結合に及ぼす尿素の影響

a. 6 M 尿素溶液中における“アクトミオシン”と色素との結合

“アクトミオシン”についてはさきにイカ肉“アクトミオシン”と MO との結合が，1 M 及び 3 M 尿素
溶液中では減少し，6 M 尿素溶液中では全く阻止されることをみた[1]。今回はマアジ及びスルメイカ肉より
抽出した“アクトミオシン”を用い実験 I b と同様な方法で 6 M 尿素溶液中における MO 及び MB との
結合をしらべた。

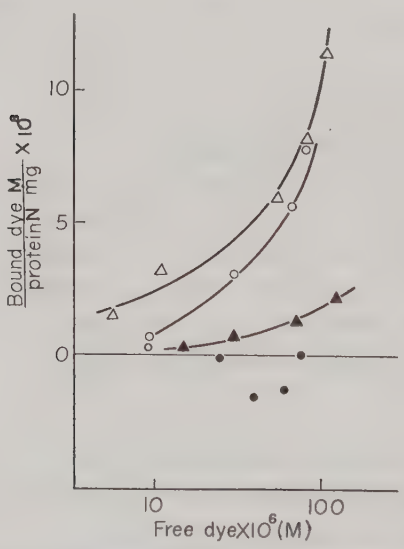


Fig. 2. Influence of 6 M urea upon binding of MO and of MB with horse mackerel “actomyosin”.
○ MO in phosphate buffer,
● MO in 6 M urea,
△ MB in phosphate buffer,
▲ MBin 6 M urea.

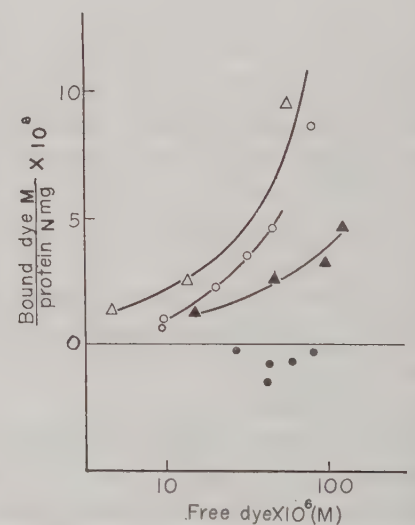


Fig. 3. Influence of 6 M urea upon binding of MO and MB with squid “actomyosin”.
○ MO in phosphate buffer,
● MO in 6 M urea,
△ MB in phosphate buffer,
▲ MB in 6 M urea.

Fig. 2 はアジ“アクトミオシン”の 6M 尿素溶液及び燐酸塩溶液中における MO 及び MB との結合を，色素の濃度をいろいろにかえて測定した結果を示したものである。Fig. 3 はイカ“アクトミオシン”についての結果である。

図に明かなようにいずれの場合も 6M の尿素溶液中では色素との結合は著しくおさえられ，殊に MO についてはアジでもイカでも全く結合が認められない。

MB の場合も尿素の存在で結合は抑えられるが，なお幾分結合することが明かに認められる。またその結合量は実験の範囲では，アジよりもイカの場合の方が大きいようである。

b. 尿素変性の可逆性

アクトミオシン* は尿素変性によつて分子の変形[6]及び分裂[7]がおこること，また尿素変性後尿素を透析して除くと，塩溶液に対する溶解性を失う[8]といわれる。

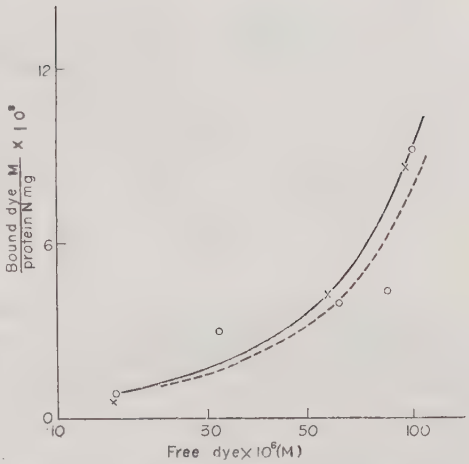


Fig. 4. Bindingof MO with carp “actomyosin” either native or recovered from urea solution.
○ Native × Recovered

しかし血清アルブミンと MO との結合に関しては尿素の作用は可逆的のように思える。即ち実験 I c にみるように，6M 尿素溶液にとかしたアルブミンを MO を含む燐酸塩溶液と透析平衡させ，尿素の濃度が 2M となるようにすると，最初から 2M の尿素溶液中で行つたものと同じ結合量を示す。

同様に“アクトミオシン”の MO との結合のさいにも，尿素の作用は可逆的であるか否かを次のようにしてしらべた。即ちコイの“アクトミオシン”を 6M 尿素溶液に溶解し，24 時間放置した後，多量の燐酸塩緩衝液に対して透析し，尿素を除去した後 MO との結合量を測定した。結果は Fig. 4 に示すように尿素との接触がこの程度の時間であるなら，尿素を透析除去した後の“アクトミオシン”は native のものと同程度の結合量を示している。即ち MO との結合に関する限り尿素の影響は可逆的であると考えられる。

摘　　要

尿素は血清アルブミンと MO との結合の生成を妨げるばかりでなく，既に出来あがつている結合をも切るという Klotz 等が血清アルブミンと MO を混合した際の吸収スペクトルの変化からえた事実を平衡透析法によつて追試確認すると共に，魚介肉“アクトミオシン”と MO 及び MB の結合に対する尿素の影響をしらべて次のような結果をえた。

1. 6M—尿素中では血清アルブミンと MO との結合はおこらない。また既成の結合も破られる。透析膜として用いたセロファンと MO の結合も 6M 尿素中ではおこらない。しかし既に出来上つている結合は 6M 尿素中に持ち来しても殆んど破れない。

2. 2M—尿素中ではアルブミンと MO との結合は著しく減るが，結合は明かに行われている。アルブミンの 6M 尿素溶液を燐酸塩緩衝液で透析し，尿素の濃度を 2M とした場合も，初めから 2M 尿素溶液を用いた場合も MO の結合量はちがわない。

3. 0.6M マロン酸アミドと 1M 尿素とは水の透電恒数の増加からみると同等の効果があるにかかわらず，マロン酸アミドはアルブミンと MO との結合を多少妨げるだけであるが，尿素は著しく妨げる。従つて尿素の妨害作用は透電恒数の増加だけで説明はできない。

4. アジ及びイカ“アクトミオシン”は 6M 尿素中では MO とも MB とも結合しない。

---

* 引用した文献にはミオシンと記載されているが，現在の命名法ではアクトミオシンとすべきものである。

2 M 尿素中では結合量はへるが，結合は行われる。

この場合今回の実験条件のもとでは，MO よりも MB，またアジよりもイカ“アクトミオシン”の方が結合し易いようである。このようにして MB と結合するばかりでなく，この結合は MO の場合よりも尿素の影響を受けることの少いことは，魚介肉“アクトミオシン”が血清アルブミンと異なる特性の一つである。

5. コイ“アクトミオシン”の 6 M 尿素溶液を 24 時間透析し，尿素を除いた後 MO との結合量をしらべると，尿素処理をしないものと同じである。2 及び 5 の結果から蛋白と MO との結合に対する尿素の作用は可逆的である。

文　　献

1) 右田正男・大竹茂夫: 本誌, **22**, 266 (1956).
2) KLOTZ, I. M., TRIIWUCH, H. and WALKER, F. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 2935 (1948).
3) BEILSTEIN: Handbuch d. Org. Chem. II. p. 582 (1920).
4) KLOTZ, I. M., WALKER, F. M., and PIVAN, R. B.: *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 1486 (1946). TERESI, J. D.: *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 3972 (1950).
5) KLOTZ, I. M. and URQUHART, J. M.: *J. Phys. & Colloid Chem.* **53**, 100 (1949).
6) MURALT, A. L. von and EDSALL, J. T.: *J. Biol. Chem.*, **89**, 375, 351 (1930).
7) WEBER, H. H.: Ergeb. physiol., **36**, 109 (1934).
8) GREENSTEIN, J. P. and EDSALL, J. T.: *J. Biol. Chem.* **133**, 397 (1940).

A Comparative Study on the Extractability of Muscle Proteins of Some Animals

Masao Migita, Juichiro J. Matsumoto and Norimichi Aoe
(*Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*)

It was found that aqueous extract of squid muscle exhibits streaming birefringence (SB)[1]. Investigating solubility behaviours of squid muscle proteins, the present authors have arrived at an assumption that the peculiarity might be accounted for either by presence of some unknown water-soluble streaming birefringent proteins, or by dissolution of "myosins" into aqueous extract[2)3)]. A remarkable fact thereby observed was as follows: When teleost muscles were subjected to repeated extractions with water, the total amount of proteins in the extracts ($\sum S$) was nearly equal to the amount of non-myosins (N), which was calculated from $N=L-M$, where L and M are the amounts of proteins extracted with salt solution and of those precipitated from the extract on dilution respectively. Therefore, what assayed here as $\sum S$ or N were conceived to comprise albumins and globulin X in muscle. But in the case of squid muscle the situation was different, that is, $\sum S$ was far greater than N. This indicates that proteins responsible for SB in aqueous extract of squid muscle behaved like "myosins" in salt solution as far as the solubility behavior is concerned, even if they might not be identical with any of known "myosins".

Development of SB in aqueous extracts of muscles has been observed by Okada *et al.*[1] with squid and all shell-fishes tested, earshell, baby clam, hen clam and fan shell, but never with fishes and shrimps. Thus development of SB in aqueous extract seems to be a characteristic of Mollusca.

Intending to know whether equality or unequality of the amounts of water extractable proteins and non-myosins are correlated to development of SB in aqueous extract of muscle, a comparative study was made with muscles of some Mollusca, Crustacea and Fishes.

Experimental

Materials and Methods

The procedures described previously were followed, unless otherwise stated[2)3)].

Received Sept. 3, 1958.
* Contribution B No. 298 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo.
Read before the Meeting of Japanese Society of Scientific Fisheries, Oct. 2, 1954.
This investigation was supported by a grant from the Research Fund of the Ministry of Education.

Materials Animals used were listed in Table 1. Muscles were taken from mantle in cephalopoda, foot in gastropoda and lamellibranchia, legs and shoulders in blue crab and abdominal segments in lobster and prawn, dorsal common muscle in fishes, and hinter limbs in bull-frog.

Muscles were chopped and ground in mortor before being extracted. With muscles of shell-fishes and snail, grinding was facilitated by addition of a small amount of quartz sand, since they were too tough to be easily disintegrated.

Table 1. General description of the muscles subjected to analysis

Name; Jap. name in ( )	Scientific name	Note	Sex	Body length & weight of animal	Physiological condition	Muscle			Season
						pH	Total prot. (%)	Prot.-N / total.-N (%)	
Squid I (Surume-ika)	*Ommastrephes sloani pacificus* STEENSTRUP	a_1	♂		Live	6.4	15.3	70.8	November
		a_2			Dead	6.2	15.6	71.7	December
		a_3			Dead	6.8	16.7	71.6	October
		a_4	♂		Dead	6.1	14.4	65.9	November
		a_5	♀	240 mm., 455 g.	Dead	6.5	14.2	69.0	June
		a_6	♂	270 g.	Live	6.3	13.9	71.0	December
		a_7				6.4			December
		a_8	♂			6.6			December
		a_9			Dead	6.0	14.7	70.8	June
Squid II (Yariika)	*Loligo breekeri* KEFERSTEIN	b_1			Dead	6.1	10.7	67.5	March
		b_2	♂	70 g.	Dead	6.6	11.0		March
Squid III (Akaika)	*Stenoteuthis bartrami* (LESUEUR)				Dead	6.7	12.5	66.9	March
Squid IV (Kooika)	*Sepia esculenta* HOYLE		♂		Dead	6.6	14.5	70.7	March
Octopus (Madako)	*Polypus Vulgaris* (LAMARCK)		♀	540 g.	Dead	6.6	11.0	74.9	September
Baby clam (Asari)	*Venerupis (Amygdala) philippinarum* (ADAM et REEVE)		♂+♀		Live	6.6	10.0	74.2	April
Abalone (Awabi)	*Haliotis (Euhaliotis) gigantea* GMELIN			140×95×35 mm., 350 g.	Live	6.5	11.6	75.2	September
Snail	*Euhadra peliomphala* (PFEIFFER)		♂+♀	Average 3.5 g. (with shell)	Live	8.1	14.6	88.9	May

Name; Jap. name in ( )	Scientific name	Note	Sex	Body length & weight of animal	Physiological condition	Muscle			Season
						pH	Total prot. (%)	Prot.-N / total-N (%)	
Flatfish (Hirame)	*Paraliclithys olivaceus* TEMMINCK & SCHLEGEL	c_1		245 mm., 280 g.	Dead		17.3		January
		c_2	♂	380 mm., 742 g.	Dead	6.7	18.3	92.4	April
		c_3	♀		Dead	6.4	19.7	89.9	April
		c_4	♂	355 mm., 800 g.	in Rigor mortis	6.4	19.7	87.9	July
Horse mackerel (Masaji)	*Trachurus japonicus* TEMMINCK & SCHLEGEL	d_1		162 mm., 59 g.	Dead	6.1	17.0	79.0	May
		d_2	♀	177 mm., 100 g.	Dead	6.4	18.9	86.5	July
Carp (Koi)	*Cyprinus carpio*	e_1	♀	262 mm., 490 g.	Live	6.8	17.7	89.7	December
		e_2	♀	288 mm., 458 g.	Live	7.3	17.8	87.8	June
		e_3	♀	260 mm., 520 g.	Live	6.8	16.6	84.8	June
Lobster (Iseebi)	*Panulirus japonicus* (V. SLEBOLD)		♂	148 mm., 240 g.	Live	7.6	17.8	75.2	September
Prawn (Saruebi)	*Trachypenarus curvirostris* (SIMPSON)		♂+♀	Average 8.6 g.	Dead	6.8	13.4	78.0	June
Blue crab (Gazami)	*Neptunus trituberculatus* MIERS	f_1	♀	71×150 mm., 190g.	Live	6.9	13.8	61.9	July
		f_2	♂	98×185 mm., 300g.	Dead	6.6	10.0	61.9	September
Bull-frog (Ushi-gaeru)	*Rana catesbiana* SHAW		♀	154 mm., 440 g.	Live	7.3	17.3	83.0	September

Extraction with water Ground muscle (10 g.) was extracted with cold distilled water (200～300 m*l*.) for 10 min. by means of a hand-made blendor[4]. Extraction was repeated 3 times, and three aqueous extracts S_1, S_2 and S_3 were obtained by centrifugation (3500～4000 r. p. m., 20 min.). Proteins in S_1, S_2 and S_3 were estimated as water-extractable proteins and expressed in $\sum S$. A minute quantity of proteins extractable by further extractions was neglected in the present experiment.

Extraction with KCl solution 10 g. of muscle were extracted with 20～40 vol. of KCl-$KHCO_3$ buffer (pH 7.5, ionic strength $I=1.0+0.03=1.03$) or KCl-phosphate buffer (pH 7.5, $I=0.85+0.15=1.0$) by a hand-made blendor for 10 min. and centrifuged. Proteins in the supernatant were estimated as salt-soluble proteins and expressed in *L*. The salt extract was diluted with water to $I=0.05$, pH being adjusted to 6.5, and was kept overnight in an ice-box. Precipitates formed were gathered and estimated

as "myosins", M. The amount of non-myosins was calculated from $N=L-M$. S, L, M and N were expressed in percentage of total muscle proteins.

Measurement of SB When an extract, aqueous or saline, exhibited SB, it was diluted serially two-fold with the same solvent (water or KCl solution), and the change of the pattern observed with a pair of the cross Nicol prisms was followed. Intensity of SB was expressed with the minimum concentration of protein which produced a pattern of a distinct cross (+) or of moving bright and dark areas (±)[2].

Results

Muscles of animals of different kind showed marked differences not only in protein contents (Table 2) and streaming birefringent property (Tables 2 and 3), but also in aspects of the precipitates spun down in extraction mixture.

Amounts of water extractable proteins and non-myosins

In fishes and bull-frog the amount of water extractable proteins lies near 20% of total muscle proteins, and in Crustacea and Mollusca, except abalone and a blue crab, the value is distinctly larger than this. Out of two blue crabs used, one (sample f_1 in Table 1) gave a value comparable with lobster and prawn, while the other (sample f_2) with fish. This might probably come from the difference in physiological conditions between the samples. Sample f_1 was live, while f_2 dead.

The biological difference of animals seems to be reflected more distinctly in the relationship of $\sum S$ to N. Thus, as a general principle, in Mollusca $\sum S > N$, in Crustacea $\sum S >$ or $\fallingdotseq N$, and $\sum S \fallingdotseq N$ in fishes and bull-frog. Abalone and the blue crabs, sample f_2 which gave values of $\sum S$ comparable with fish, are no exception here.

Streaming birefringence Development of SB in aqueous extract was detected only in molluscan muscles, and SB in saline extract was observed in muscles from animals other than shell-fish and snail.

Concerning the intensity of SB in salt extracts, it seems likely that Cephalopoda and Crustacea show always stronger SB than fishes.

Precipitates spun down in aqueous extraction mixtures

Some differences were observed in aspects of precipitates obtained in the second and third extractions, when muscles were repeatedly extracted with water and the extraction mixtures were centrifuged.

In squid muscle, as previously reported, precipitates in the first extraction are white, opaque and rather compact, forming the bottom layer. The supernatant liquid (A-phase) could be decanted without disturbing the bottom layer. In the second and later extractions, a part of precipitates swelled into translucent paste to form a new layer (C-phase) above the residue consisting of connective tissues (B-phase). Upper part of C-phase turned into a fluid suspension (D-phase) which flows out on decantation.

In carp muscle, the aspects of precipitates showed no noticeable change by repeated

extractions, that is, the precipitates in the second the later extractions were less swelled and less translucent compared with C-phase in the case of squid muscle.

In crustacean muscle, part of precipitates in the second and later extractions

Table 2. Comparison of the amounts of water-extractable proteins and non-myosins of muscles of various animals

Animal	Water-extract; SB in ( )				Comparison	Non-myosins	Salt-soluble protein; SB in ( )	Aspect of aqueous extraction ppt.*	Remarks
	S_1	S_2	S_3	ΣS					
Squid I	22.5(−)	14.3(+)	8.7(+)	46 a_1	>	17 a_3	61(+)	C- and D-phase in II and III	
	24.5(−)	6.1(−)	11.8(±)	42 a_2		10 a_4	72(+)		a_2. extracted repeatly with ×40 volumes of water
						22 a_5	76(+)		
						16 a_6	56(+)		
Squid II	12.6(−)	5.0(+)	10.0(+)	28 b_1	>	17 b_2	89(+)		b_1 ×5 volumes of water
Squid III	17.4(−)	10.8(+)	6.4(+)	33					
Squid IV	17.7(−)	11.0(±)		29					
Octopus	20.8(−)	16.8(+)	9.0(+)	47	>	22	51(+)		
Baby clam	20.9(−)	12.3(−)	11.5(+)	35	>	17	47(−)	C-phase and little D-phase in III	
Abalone	10.9(−)	4.2(+)	5.9(+)	21	>	5	48(−)	C-phase in II and III	
Snail	32.3(+)	6.0(±)		38	>	20	46(−)		
Flatfish	13.5(−)	2.9(−)	2.1(−)	19 c_1	≒	15 c_2	63(+)		
						18 c_3	45(+)		
	16.6	2.0		19 c_2†		24 c_4	91(+)		† Extracted with Waring blendor (10,000 r.p.m.)
Horse mackerel	15.5(−)	3.1(−)	1.5(−)	21 d_1	≒	23 d_1	89(+)		
						21 d_2	91(+)		
Carp	19.1(−)	4.4(−)	1.8(−)	25 e_1	≒	23 e_2	84(+)	e_1 very few D-phase in II and III	
						25 e_3	87(+)		
Lobster	29.0(−)	16.0(−)	8.2(−)	53	>	24	62(+)	J-phase in II and III	
Prawn	26.0(−)	9.3(−)	7.2(−)	43	> or ≒	36 f_1	92(+)	〃	
Blue crab	26.6(−)	7.5(−)	7.3(−)	41 f_1	>	19 f_1	56(+)	〃	
	17.1(−)	2.9(−)	1.2(−)	21 f_2	>	14 f_2	94(+)		
Bull-frog	17.2(−)	3.8(−)	4.4(−)	25	> or ≒	21	43(−)	J-phase in II and III	

1) a_1....f_2 are notes of samples listed in Table 1.

2) The extraction mixtures of the first, second and third extractions are expressed as I, II, III respectively.

* In the case without particular description, less swollen, less translucent residual layer was found covering B-phase.

Table 3. Relative intensity of streaming birefringence of the proteins in water and salt extracts of various animals

Animal	Extractant	Preparation	Solvent used in serial dilution	Minimum protein concn. (mg./ml.) to give +SB	to give ±SB
Squid I	Water	S_2	Water	0.20	— a_1
				0.30	— a_2
				0.50	0.25 a_3
Squid III	Water	S_2	Water	1.34	0.33
	Water	S_3	Water	0.89	0.22
Squid IV	Water	S_2	Water	—	0.20
Octopus	Water	S_2	Water	0.24	0.12
	Water	S_3	Water	0.12	—
Baby clam	Water	S_3	Water	0.28	0.14
Abalone	Water	S_3	Water	0.09	0.04
Snail	Water	S_2	Water	—	0.30
Squid I	Water	C-phase	Water	0.41	— a_7
				0.72	0.36 a_8
				0.36	0.18 a_8
Squid I	1 M KCl	Myosins	Water	0.44	0.22 a_3
				0.29	0.15 a_4
Bull-frog	Water	J-phase suspended in water	Water	0.86	—
Squid I	1 M KCl	Whole extract	0.5 M KCl	1.12	0.56 a_4
				1.10	0.55 a_5
				0.47	0.24 a_7
Octopus	1 M KCl	Whole extract	0.5 M KCl	1.63	—
Flatfish	1 M KCl	Whole extract	0.5 M KCl	3.5	1.7
Horse mackerel	1 M KCl	Whole extract	0.5 M KCl	3.7	—
Carp	1 M KCl	Whole extaact	0.5 M KCl	2.7	1.4 e_2
				2.6	1.3 e_3
Lobster	1 M KCl	Whole extract	0.5 M KCl	0.92	0.46
Prawn	1 M KCl	Whole extract	0.5 M KCl	1.7	0.86
Blue crab	1 M KCl	Whole extract	0.5 M KCl	0.64	0.32 f_1
				1.05	— f_2
Bull-frog	1 M KCl		0.5 M KCl	1.97	—
Squid I	1 M KCl	(Myosins)	0.5 M KCl	1.17	—
Octopus	Water	S_2	0.5 M KCl	0.49	—

swelled markedly and spread in supernatant layer (A-phase), forming a dilute jelly-like layer (J-phase). This layer occupied a greater part of the liquid phase and flowed out together with supernatant liquid on decantation. The jelly-like nature of this new layer was presumed from the fact that, when the layer was swayed gently, it moved as a whole as if particles were linked together mutually. The supernant itself did never show SB, but it did show intense SB if contaminated with J-phase.

Discussion

Results of the experiments seem to indicate that muscles of used animals could be roughly grouped into three types: Mollusca-, Crustacea-, and Fish-types. Characteristics of each groups are illustrated in Table 4.

Table 4. Characteristics of three types of muscle

Type	SB of aqueous extract	Relationship between $\sum S$ and N	Ppt. in the 2nd and later extractions
Mollusca	+	$\sum S > N$	B-phase, C-phase and D-phase
Crustacea	−	$\sum S >$ or $\fallingdotseq N$	B-phase, a compact pasty phase, and J-phase
Fish	−	$\sum S \fallingdotseq N$	B-phase and a compact pasty phase

Muscle of bull-frog belongs to Fish-type when judged by the relationship of $\sum S$ to N, but rather to Crustacean-type when judged by aspects of precipitate.

With development of SB in aqueous extract of squid muscle, the authors[2)3)] have previously been led to the assumption stated before that this might be ascribed to either the presence of some water-soluble streaming biregringent protein which exhibits solubility behaviours similar to "myosins" in salt extract, or the dissolution of some "myosins" into aqueous extract for some reason. This seems to hold good generally for Mollusca muscles, since their aqueous extract exhibits SB and contains water-soluble proteins far exceeding non-myosins in amount.

The relationship $\sum S > N$ was also found in muscles of lobster and prawn, but SB is not detected in their aqueous extract. This may suggest possible presence of some water soluble protein which is not streaming birefringent but shows solubility behaviors similarly to the "myosins" in salt solution.

As regards salt extract of muscles of shellfishes and snail, no SB was found in the present study, while a good amount of "myosins" was found in the salt extracts of these muscles (64% in baby clam, 89% in abalone and 53% in snail, per total proteins in solution respectively). On the other hand, Okada and Tada[1)] have reported that they detected *weak* SB in saline extracts of earshell (abalone) as well as hen-clam, while could not in those of baby clam and fan shell. Although some inconsistency exists between the present data and Okada's one, it seems probable that SB of shellfish- and snail-salt extracts might be generally so weak that it often escapes from being detected by such an SB-apparatus as used by the authors which was not designed for high precision.

If the intensity of SB of many extracts is compared in terms of minimum protein concentration for showing SB (Table 3), molluscan muscle proteins appear to give weaker SB in salt extract than in aqueous extracts, though not without some exceptions.

It is interesting to note that tropomyosin is streaming birefringent and of high

viscosity in aqueous solution, but loses SB and high viscosity in the presence of inorganic salts[5], and that tropomyosin has been isolated by Bailey as a predominant protein of of shell-fish muscle[6]. Disappearance of SB in salt solution has been observed also in rabbit myosin[7] and Weber and Portzehl[8] ascribed this to the change in dispersion state of the myosin. Thus myosin proper of Szent-Györgyi exists in water as transparent gel which gives SB, while in 0.5 M KCl it dissolves into a clear solution and loses SB.

In Table 3, SB of salt extract of squid, octopus, and Crustacea muscles appear to be stronger than that of fishes. This might be explained either by difference in nature of the streaming birefringent protein itself, or by some effect of coexistent substances, say, inorganic salts, in the extract. The conclusion, however, should be drawn on further investigation.

Stability of aqueous extract seems to vary with the type of muscle. Aqueous extract from Crustacea and bull-frog muscle produced white flocculent precipitate after one or two night cold storage, while the first aqueous extract of squid yielded white fine precipitate only after several days, but that of fish showed no appreciable change.

When flat-fish muscle was extracted twice by means of Waring blendor (ca. 10,000 r. p. m., 2 min.) instead of the hand-made blendor, a part of precipitates in the second extraction mixture swelled to form a dilute jelly-like layer (J-phase) as in the case of Crustacea muscle. This layer was, however, rather denser than that formed in the case of Crustacea. Thus the aspects of precipitates in aqueous extraction mixtures obtained from vigorously disintegrated fish muscle resemble those of Crustacea-type. This seems to suggest that differences observed between these two types might partly owe to the difference in mechanical toughness of tissue texture.

Extractability of muscle proteins is, as well-known, affected by history of sample. Therefore, there may be doubt in validity of the argument here in which results obtained with muscles from animals in different physiological conditions are compared on equal terms. But a series of experiments with muscles of squid and flat-fish of vastly different freshness distinctly show existence of type characteristics for each animal.

Summary

Intending to know whether the quantitative relationship of water-extractable proteins to non-myosins in muscle is correlated with the development of SB in its aqueous extract, a comparative study was made with muscles of some Mollusca, Crustacea, fishes and bull-frog.

(1) Muscles of used animals were found to be practically grouped into three types: Mollusca-, Crustacea-, and Fish-types (cf. Table 4).

(2) In Mollusca-type muscles SB was detected in aqueous extracts and water soluble proteins far exceed non-myosins in amount ($\sum S > N$).

(3) In fish and Crustacea-types SB was not detectable in aqueous extracts, and $\Sigma S \fallingdotseq N$ in the former but $\Sigma S >$ or $\fallingdotseq N$ in the latter.

(4) Intensity of SB of salt extracts was apparently greater in Cephalopada and Crustacea than in fishes.

(5) Muscles showed each characteristic pattern corresponding to the three types also in aspects of precipitates spun down in aqueous extraction mixture.

References

1) Okada, M. and Tada, S.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 224~231 (1954)
2) Migita, M. and Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **20**, 641~652 (1954)
3) Migita, M. and Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **23**, 703~709 (1958)
4) Matsumoto., J. J.: *J. Jap. Chem.*, **9**, 202~203 (1955)
5) Bailey, K.: *Biochem. J.*, **43**, 271~279 (1948)
6) Bailey, K.: *Biochem. Biophys. Abta*, **24**, 612~619 (1957)
7) Szent-Györgyi, A.: "Chemistry of Muscular Contraction", Academic Press, New York (1947) p. 5.
8) Weber, H. H. and Portzehl, H: "Advances in Protein Chemistry," VII, 196 (1952)

マグロ青肉に関する研究—I.

キワダ青肉及び正常肉のビタミンB群，無機質の含量

平尾秀一・村山繁雄・簗瀬正明
山田充阿弥・菊地嶺・田部井菊子
(東海区水産研究所)

木坂健次・榎本吉宏
(日本輸出冷凍水産物検査協会)

Study on the Green Meat of Tuna—I.

Quantitative Differences of Vitamin B Group and Minerals between the Green and the Normal Meat of Precooked Tuna.

Shuichi Hirao, Shigeo Murayama, Masaaki Yanase,
Juami Yamada, Ryo Kikuchi and Kikuko Tabei
(Tokai Resional Fisheries Research Laboratory)

Kenji Kisaka and Yoshihiro Enomoto
(Japan Export Frozen Marine Product Inspection Cooperation)

"Greening" is a term referred to a phenomenon which makes tuna meat discolor into a disagreeable greenish brown as is often met with the meat precooked for canning.

A few investigators, reporting the independency of this phenomenon on either of the method of catch and the degree of freshness, have assigned its origin before to some individual abnormality inherent to the fish in question. Any further information, however, has not been presented thereafter about the nature of the origin of "greening".

The authors, now, considering some anomaly in vitamin B group and minerals in muscular system for the cause of the greening, measured their quantities in both greened and normal samples of yellowfin tuna. From the results may be formed the following summary:

In comparison with normal meat, green meat is rich not only in moisture but in B_{12} and poor in B_6. As for the contents of riboflavin, folic acid and pantotheic acid no striking contrast prevails between the two types of meat (Tables 1～2, Figs. 1～3).

Nevertheless, it may be worthy of note that, while for normal meat little positive relation can be found between the contents of riboflavin and folic acid, these two vitamins vary in amount in a distinct correlation with each other in greened meat (Table 3).

The amount of mineral constituents seems to be independent of the degree of greening, but it should be remarked that two samples of green meat showed an extraordinary low level of phosphorus content.

These findings will provide a clue to the resolution of biochemical causes of the greening.

緒　　言

青肉とはキワダ，メバチ，ビンチヨウ等の肉を缶詰加工する際，蒸煮肉が緑黄色或いは緑褐色を呈し*，著

1958 年 9 月 29 日受理　東海区水産研究所業績B第 299 号

* 第三報　本誌，pp. 679～681，原色図版 Fig. 1 参照

しく外観を損ずる現象をいう。正常肉と青肉とを判別することは蒸煮前には困難で，青肉は魚体を蒸煮し放冷した後に始めて発見されるため，現在米国向けに輸出されている冷凍マグロ（主にキワダ）の約5%が米国で蒸煮の際青肉となり，これが輸出マグロのクレームの大部分を占めている。

青肉の成因に関して恒田，天野ら[1]はビンチョウを材料として種々の角度から調査を行つた結果，青肉は漁獲方法や死後の取扱い方法の如何等による二次的原因で発生するものではなく，生活時において既に何等かの点で異常体質の個体があり，これが蒸煮によつて青肉となるものと推察しているが未だに具体的な結論には到達していない。

魚体を蒸煮する前に青肉の発現を予知することができれば，輸出に不適な原料は他に転用することも可能となるが，現在までの諸研究においてはまだ成功していない。尤も青肉の甚だしい個体はなまの肉色からその発現を予知することが或る程度可能で，業者間では多年の経験により肉眼による判定が行われている。しかしクレームの規格線すれすれにあるごとき軽度の青肉個体は発見が極めて困難である。高橋・山下[2]はなま肉の反射スペクトルの測定により青肉を予知する装置を考案したが，横山・木坂[3]はこれを追試して否定的な結果を報じている。

青肉個体が生活時において正常肉個体とは異つた生理を営んでいるものとすれば，両者の間にビタミン類及びミネラル等の量的な差異が観察されるはずである。著者等はこの方面から青肉発生の生化学的要因を調べ青肉の予知法にまで及ぼしたいと考えて本研究に着手した。

本報にはキワダの青肉個体及び正常個体につき，肉のビタミンB群及び無機質の含量を比較した結果をのべる。

試料及び実験方法

試料の採取及び蒸煮試験は 1958 年 6 月 6 日～7 日，静岡県清水市の大同水産KK缶詰工場において行つた。

キワダ（体重 42～35 kg）30尾を選び試料番号を附した後，肉を4つ割とし尾部に近い部分（尾びれ基部より数えて離びれ6番目から9番目）の正肉をほぼ 10×7×3cm 角の大きさに切取つて分析用試料とした。試料は分析までドライアイスと共にマホウ瓶に保存した。

次に各身割肉を蒸煮し，一夜放冷後釜から取出し，前回の試料採取部位に近い処を切断し，断面の色調から青色の発現度を観察記録した。

試料としたなま肉及び蒸煮肉の色は個体毎に相異するが，これを分光学的方法で記録することは困難であるので五感検査により等級を附した。即ちなま肉においては；キワダ特有の色沢を有するものを a，色沢がやや劣るものを b，b よりも褪色し黒ずんだ感のあるものを b′，明かに褪色し色沢のわるいものを c として記録した。この判定に当つた実験者は多年検査に従事しており，Table 1 に示すごとく或る程度蒸煮後の結果と一致している。

蒸煮後の肉色の判定は次のごとくにした。即ち；最も淡色にして色沢も良好で缶詰規格の fancy A に入るものを5点，最も緑色濃く明かに青肉と認められるものを1点として採点することに定め，実験者7名が各々独立に判定採点を行い，その平均値を以て品質の程度を示すこととした。

一般に軽度の青肉の判定は比較的困難であるが，本実験における各人の採点結果は互いにほぼ一致した傾向を示していた。

各試料肉につき水分，ビタミン B_2（ルミフラビン法），B_6（Saccaromyces carlsbergensis），葉酸（Streptococcus faecalis），パントテン酸（Lactobacillus arabinosus），B_{12}（Euglena gracilis v. bacillaris）及び Ca, P, Fe を測定した。（カッコ内は使用微生物名）

実験結果

各試料につき水分，B_2，B_6，B_{12}，葉酸，パントテン酸，及び Ca, P, Fe の量を測定した結果を Table 1

Table 1. Contents of vitamins and minerals in normal or off-colored meat of yellowfin tuna.

Sample No.	Decision on raw meat* 生鮮時の判定 Color 色調	Odor 臭	Decision after cooking 蒸煮後の判定	*Moisture 水分	Color when dried at 100°C 3h. 乾燥した固形物の色調**	Vitamins in raw meat なま肉のビタミン含量 B_2	B_6	Pantothenic acid パントテン酸	Folic acid 葉酸	B_{12}	Minerals in raw meat なま肉の無機質含量 Ca	P	Fe
				%		γ/g	γ/g	γ/g	mγ/g	mγ/g	mg%	mg%	mg%
1	A	A	5.0	74.9	3.5	0.41	6.66	1.86	4.60	0.444	4.3	270	1.2
2	A	A	5.0	73.8	3.7	0.41	7.08	1.41	3.33	0.693	6.6	314	1.8
3	C	A	4.5	—	3.6	0.23	16.24	2.17	3.67	0.880	5.0	251	1.1
4	A	B	4.4	74.0	3.5	0.29	12.56	2.23	9.00	1.431	7.8	283	2.2
5	A	B	4.3	72.4	4.2	0.22	17.08	2.00	22.33	0.820	8.8	296	1.9
6	A	B	4.3	76.0	5.0	0.07	7.50	1.42	6.00	0.391	5.9	230	1.0
7	A	C	4.3	73.9	3.2	0.10	7.92	1.73	2.00	0.320	5.4	258	1.2
8	A	B′	4.1	74.9	4.7	0.22	10.84	1.85	5.57	0.249	6.6	294	4.7
9	A	B	3.9	76.2	4.8	0.19	12.92	1.88	6.33	0.773	4.2	287	5.0
10	A	B	3.6	73.5	4.2	0.15	13.74	1.81	24.33	1.093	7.5	281	3.8
11	C	B′	3.6	76.3	3.5	0.27	12.92	1.60	2.67	0.676	4.8	283	1.3
12	B	A	3.4	74.1	3.8	0.19	9.58	1.77	4.63	0.951	5.9	276	1.4
13	B	B′	3.3	74.0	3.2	0.52	8.34	1.75	—	0.870	10.0	280	5.8
14	A	A	3.3	75.4	4.6	0.28	7.24	2.71	6.37	0.702	4.7	275	1.5
15	C	A	3.1	76.0	3.5	0.33	7.92	—	4.00	0.818	6.1	298	1.5
16	B	B′	3.0	74.8	4.3	0.25	11.66	1.86	6.30	0.631	7.0	303	6.8
17	A	C	3.0	75.5	4.0	0.67	7.50	1.82	7.67	0.658	8.6	235	2.6
18	C	B	2.7	75.0	3.0	0.21	8.74	2.24	1.67	0.773	4.5	283	2.8
19	C	A	2.6	74.7	3.8	0.21	5.00	1.85	4.07	0.533	4.7	291	1.5
20	B	B′	2.1	74.5	3.5	0.31	7.08	2.27	5.00	0.818	6.7	300	1.3
21	B	A	1.9	—	2.3	0.22	7.92	1.67	2.07	0.676	6.6	149	1.3
22	A	B′	1.9	77.9	2.7	0.18	7.92	1.76	15.73	0.622	4.9	319	2.6
23	C	B′	1.9	77.9	3.2	0.36	10.00	1.73	5.33	0.693	7.4	174	2.1
24	C	C	1.7	75.0	3.2	0.22	10.84	1.65	7.33	0.533	5.3	264	2.9
25	C	C	1.6	74.9	3.3	0.15	6.66	1.67	1.67	1.511	6.4	317	1.7
26	C	B′	1.1	76.0	1.6	0.14	5.84	1.97	2.80	1.071	4.3	245	1.2
27	C	C	1.1	—	2.0	0.50	6.66	2.23	4.67	0.862	5.6	248	1.0
28	C	C	1.0	77.3	1.6	0.30	7.24	1.72	5.67	0.996	7.8	270	3.8
29	C	C	1.0	76.7	1.6	0.13	6.66	1.57	5.60	0.818	7.8	275	4.2
30	B	B	1.0	—	1.0	0.14	7.08	1.66	5.67	1.893	3.9	253	1.4

* In the colomn color: A, the meat having light and characteristic color to yellowfin tuna. B, somewhat discolored. C, discolored.

In the colomn oder: grade is expressed in decreasing freshness from A, B, B′, to C.

** Graduations from 1 for green meat to 5 for normal meat were independently determined and averaged.

に示す。測定値はいずれも相当のバラツキを示したが，これら各成分の含量と青肉との相関を計算するとTable 2 のごとくなる。即ち青肉は正常肉に比し水分多く，B_6 の含量低く，反対に B_{12} 含量が高い傾向が認められた。この関係を Fig. 1～2 に示した。

B_2，パントテン酸，葉酸，Ca, P, Fe の含量と青肉の程度との間には相関が認められなかつたが，青肉のうちの2例がPの量の著しく少ないものがあつた。

次に青肉と正常肉とでは各ビタミン相互の比率及びCa と P との比率に差異があるか否かを検するため試料を No. 1～20（正常なもの及び青肉のごく軽度のもの），No. 21～30（青肉の著しいもの）の二群に分ち，各々の群についてビタミン類相互の関係を求めた結果

Table 2. Correlation between the contents of vitamins and minerals to the color of precooked meat.
第2表　肉色と各成分含量との相関

	n	r	Significant level 有意限界 0.05
Moisture	26	− **0.574**	0.3809
B_2	30	0.322	0.3494
B_6	30	**0.695**	〃
B_{12}	30	− **0.343**	〃
Pantothenic acid	29	0.0076	〃
Folic acid	29	0.143	〃
Ca	30	0.049	〃
P	30	0.217	〃
Fe	30	0.122	〃

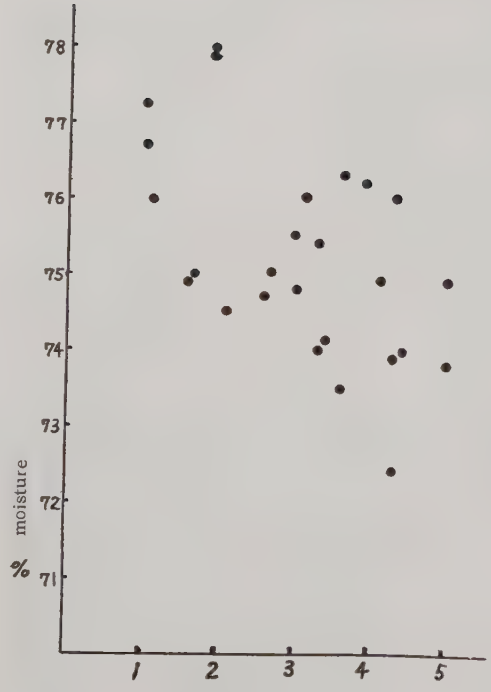


Fig. 1. Relation between moisture and the color of precooked yellowfin tuna meat.
キワダ肉の水分含量とその肉を蒸煮した時の色調の良否との関係

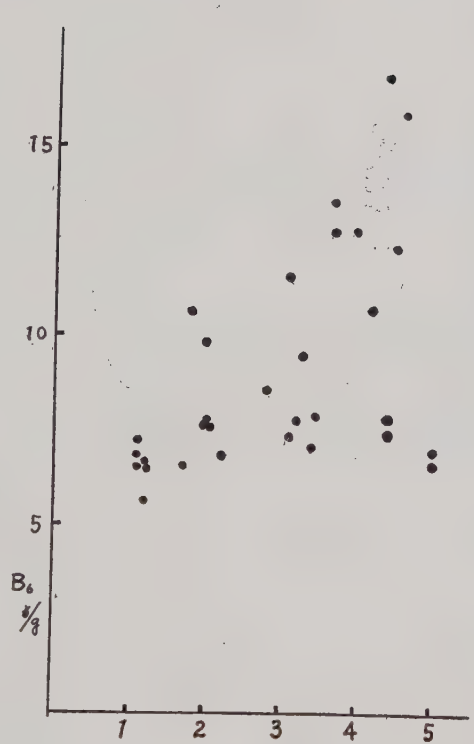


Fig. 2. Relation between vitamin B_6 and the color of precooked yellowfin tuna meat.
キワダ肉の B_6 含量とその肉を蒸煮した時の色調の良否との関係

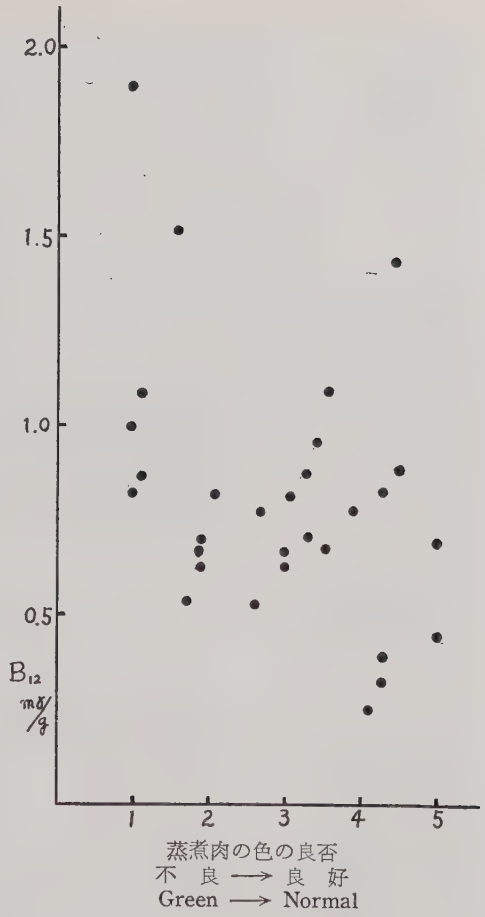


Fig. 3. Relation between vitamin B_{12} and the color of precooked yellowfin tuna meat.
キワダ肉の B_{12} 含量とその肉を蒸煮した時の肉色の良否との関係

Table 3. Correlation among the vitamins in normal and green meat.
第3表　正常肉と青肉におけるビタミン相互の関係

		n	r	Significant level 有意限界 0.05
B_2 : B_6	Normal	16	0.3874	0.4973
	Green	9	0.0316	0.6664
B_2 : Folic acid	Normal	15	0.1017	0.5139
	Green	9	**0.7261**	0.6664
B_6 : Folic acid	Normal	15	0.2087	0.5139
	Green	9	0.2514	0.6664
Folic acid : Pantothenic acid	Normal	16	0.0720	0.4973
	Green	8	0.3176	0.7067

は Table 3 の通りである。

即ち B_2 対 B_6, B_6 対葉酸，葉酸対パントテン酸においては青肉，正常肉いずれにおいても量的関係は認められなかつたが，B_2 と葉酸との間には青肉において有意の関係が認められた。しかし正常肉においては全く認められなかつた。

考　　察

本実験の試料魚はいずれも南洋産で死後相当の日数を経たものである。鮮度は比較的良好であつたが，必ずしも全試料が同程度の鮮度ではなかつた。

B群の含量は試料の鮮度によつて影響をうけるであろうから本実験の結果が直ちに魚の生活時における様相を示すものとは断定できないが，仮に本試料の間で試料の鮮度のバラツキとそれに伴うB群含量の変化とが統計的に相殺されているものとすると，本実験の結果は或る程度魚の生活時の状態を反映するものということになる。

本実験においては脂肪量を測定しなかつたが，青肉には水分がやや多い傾向があることから，脂肪の量が正常肉より少ないことが想像される。このことは B_6 が生体内で脂質，炭水化物等の代謝に関与しているという従来の知見と考え合せれば，今後青肉を生化学的に調べていく上の一つの手懸りとなり得るであろう。

青肉の個体に B_{12} 含量が高い傾向のある理由についても今後の研究に俟たなければ，明瞭な説明は附し得ないであろうが，B_{12} が造血作用に関与するビタミンであることと，青肉の色素が血色素系の蛋白色素乃至はその変性物質であろうという従来の知見[4]とも関連する現象であると思われる。

本実験の青肉個体の中にたまたまPが異常に少ない例が見出されたが，これも青肉魚体内における生活機能の異常性を反映するものであろう。但しこの個体（2例）のB群及び Ca, Fe の含量については，他の正常及び青肉個体のそれに比し特に著しい差はなかつた。

摘　　要

キワダの青肉個体と正常肉個体とにつきビタミンB群，Ca, P, Fe の含量を比較し，青肉は正常肉に比し水分多く，B_6 が少なく，B_{12} が多い傾向を認めた。

又青肉の中に P が異常に少ない例があつた。

本研究に当り終始御指導を頂いた東秀雄博士ならびに実験に協力せられた大同水産株式会社に厚く謝意を表する。

文　　献

1) 恒田信郎外・天野慶之外：静岡缶詰協会報.
2) 高橋信之・山下六郎：日本輸出冷凍水産物検査協会資料
3) 横山　浩・木坂健次：日本輸出冷凍水産物検査協会研究資料 13 号 (1957)
4) NAUGHTON, J. J., et. al: Special Sci. Rep. Fish. No. 197, U. S. A. (1956); *ibid.* No. 247 (1957).

マグロ青肉に関する研究—Ⅱ.

キワダ青肉及び正常肉個体の腎臓中のビタミンB群, 無機質の含量

平尾秀一・村山繁雄・簗瀬正明
山田充阿弥・菊地嶺・田部井菊子
(東海区水産研究所)

木坂健次・榎本吉宏
(日本輸出冷凍水産物検査協会)

日本水産学会誌
第二十四巻 第八号 別冊
昭和三十三年十二月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, No. 8, Dec. 1958

マグロ青肉に関する研究—II.

キワダ青肉及び正常肉個体の腎臓中のビタミンB群, 無機質の含量

平尾秀一・村山繁雄・簗瀬正明
山田充阿弥・菊地 嶺・田部井菊子
(東海区水産研究所)

木坂健次・榎本吉宏
(日本輸出冷凍水産物検査協会)

Study on the Green Meat of Tuna—II.

Quantitative Differences of Vitamin B Group and Minerals in Kidney between Green and Normal Bodies of Yellowfin Tuna.

Shuichi Hirao, Shigeo Murayama, Masaaki Yanase,
Juami Yamada, Ryo Kikuchi and Kikuko Tabei
(Tokai Resional Fisheries Research Laboratory)

Kenji Kisaka and Yoshihiro Enomoto
(Japan Export Frozen Marine Product Inspection Cooperation)

In the previous paper the authors presented a few data for the vitamin B group and minerals in the green and the normal meat of yellowfin tuna. To make an approach to the biochemical cause of the greening, however, it is desirable to collect the data for the internal organs, as well. As most of the internal organs of yellowfin tuna are separated from the body immediately after the catch it is difficult to collect their samples except the kidney which is found always left in the body. For this reason the authors conducted experiments with kidney in a way similar to that taken for meat.

In comparison with normally colored fish greened body was found to contain a larger amount of moisture, less phosphorus in kidney with a very small ratio of P : Ca.

No definite correlation was observed between the B group content and the greening while the riboflavin and the folic acid contents were found to vary in parallel with each other in the case of greened samples. But such a relation can hardly be detected with normal samples.

緒　　言

前報[1]にキワダにつき青肉と正常肉のビタミンB群および無機質の含量を測定した結果をのべたが，体成分の異同から青肉の成因を探ろうとするには，肉よりも内臓について実験を行う方がより明確な結果が得られるはずである。一般にキワダは漁獲後直ちに内臓を除去されるため上記の検討を行うことができないが，腎臓のみは大低の場合，腹腔中に残留しているのでこれについて前報と同様の実験を試みた。

実験及び結果

試料を採取した魚体は前報の実験に用いたものと同じである。30 尾の試料魚の内 4 尾は腎臓が残留していなかつたが，これは内臓除去作業の際一緒に除かれたものであろう。他の 26 尾からは腎臓の一部乃至全部を採取することができた。

1958 年 9 月 29 日受理　東海区水産研究所業績B第 300 号

Table 1. Contents of vitamins and minerals in the kidney of yellowfin tuna samples varying in color of meat.

第1表　肉色の種々異なるキワダにおける腎臓の成分

Sample No.	Grade of color of precooked meat*	Moisture	B_2	B_6	Pantothenic acid	Folic acid	Ca	P	Fe
		%	γ %	γ %	γ %	γ %	mg %	mg %	mg %
1	5.0	61.4	460	1,225.0	306.4	36.0	43.9	598	82.3
2	5.0	74.6	414	722.6	158.4	86.4	23.1	401	85.5
3	4.5	75.7	457	615.0	363.2	161.6	30.0	348	60.3
4	4.4	76.2	348	635.0	264.0	185.6	24.9	355	44.1
5	4.3	—	274	440.0	178.4	—	—	—	—
7	4.3	71.6	—	585.0	306.4	113.6	32.2	402	156.4
8	4.1	—	292	565.0	224.0	80.0	—	—	—
9	3.9	75.7	384	—	297.6	102.4	23.5	287	13.1
10	3.6	76.0	327	575.0	208.0	72.0	38.4	509	214.0
11	3.6	74.6	589	484.0	188.8	179.2	34.6	407	85.6
12	3.4	73.1	535	492.6	289.6	111.2	28.9	399	73.2
13	3.3	—	281	425.0	—	—	—	—	—
14	3.3	73.9	498	520.0	298.4	94.4	26.6	412	109.0
15	3.1	76.9	454	500.0	312.0	160.0	29.7	352	46.2
17	3.0	62.3	387	485.0	224.0	59.2	101.0	582	118.0
18	2.7	74.4	359	413.6	297.6	45.6	25.2	339	85.8
19	2.6	74.0	471	474.8	207.2	165.6	—	—	—
20	2.1	74.2	517	530.0	203.2	61.6	—	—	—
21	1.9	72.1	508	540.4	331.2	144.0	37.3	424	69.0
22	1.9	81.2	605	670.2	—	156.8	31.4	291	55.3
23	1.9	76.3	288	230.4	242.4	94.4	32.6	371	71.6
24	1.7	76.5	557	365.0	229.6	169.6	—	—	—
25	1.6	76.8	481	625.2	256.8	150.4	41.2	360	42.4
26	1.1	77.2	715	750.4	222.4	172.0	54.9	413	110.0
27	1.1	75.3	367	1,400.0	261.2	85.6	27.6	227	49.2
29	1.0	75.8	448	372.6	211.2	51.2	39.4	379	115.0
30	1.0	78.3	483	1,375.0	191.2	80.0	37.1	326	91.7

* Graduations from 1 for green meat to 5 for normal meat were independently determined by several persons and averaged.

Table 2. Correlation between color of yellowfin tuna meat and the components of the kidney.

第2表　肉色と腎臓の各成分含量との相関

	n	r	Significant level 有意限界 (0.1)
Moisture	24	**−0.324**	0.3233
B_2	26	−0.2854	〃
B_6	26	−0.114	〃
Pantothenic acid	25	0.0613	〃
Folic acid	25	0.0416	〃
Ca	21	0.0048	0.3687
P	21	**0.380**	〃
Fe	21	0.2430	〃
P/Ca	21	**0.694**	〃

Table 1 に水分，B_2，B_6，パントテン酸，葉酸，Ca，P，Fe の含量を示す。表中肉色の判定度の数値は，肉色が淡いピンクで良好なものを 5，緑褐色で著しい青肉と認められるものを 1 として評点した数値である。

各測定値はいずれも相当のバラツキを示しているが，これらの数値と肉色との相関を検すると，Table 2 に示すごとき数値が得られる。即ち青肉の腎臓は正常肉のそれに比し水分が多く，P が少い傾向がある。

腎臓の Ca と肉色とには相関がみられないが，P/Ca を計算してみると，P のみの場合よりも遙かに相関が大であつた。この関係を Fig. 1 に図示した。

腎臓の B_2，B_6，パントテン酸，葉酸の量と肉色には相関がみられなかつた。

次に試料を青肉の著しい個体（No. 21～30）と正常のもの及び青肉の軽度のもの（No. 1～20）との 2 群に分け，それぞれの群について B_2 と B_6，B_2 と葉酸，B_6 と葉酸，葉酸とパントテン酸と量的関係を検した結果は Table 3 に示すごとく B_2 と葉酸の含量のみが青肉群において有意（危険率 10%）の相関を示したが，正常群においては全く相関がみとめられなかつた。

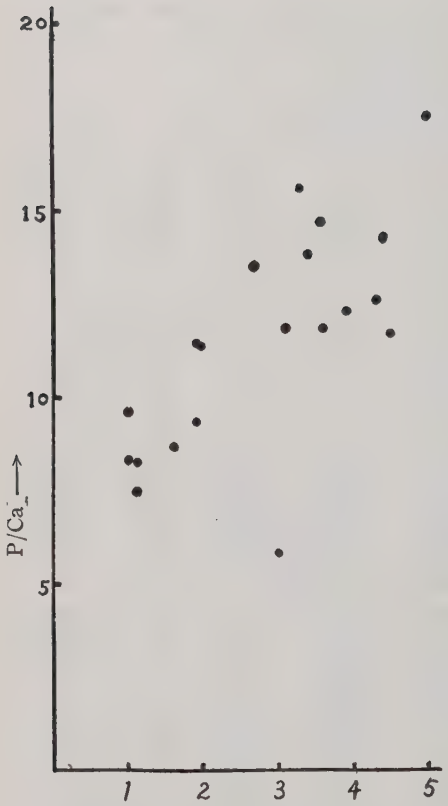


Fig. 1. Relation between P/Ca ratio in the kidney and color of the precooked meat of yellowfin tuna.
キワダ蒸煮肉色の良否とその腎臓中の P/Ca 比との関係

Table 3. Correlation among the vitamins determined on the kidney in a green and a normally colored body of yellowfin tuna.
第3表　キワダ正常肉及青肉個体の腎臓のB群の量的相関

	Sample	n	r	Significant level 有意限界 (0.1)
B_2 : B_6	正常肉の腎臓ⓐ*	16	0.1322	0.4259
	青肉の腎臓ⓑ	9	0.0316	0.5822
B_2 : Folic acid	正常肉の腎臓ⓐ	17	0.1017	0.4124
	青肉の腎臓ⓑ	9	**0.6010**	0.5822
B_6 : Folic acid	正常肉の腎臓ⓐ	15	0.2080	0.4409
	青肉の腎臓ⓑ	9	0.2514	0.5822
Folic acid : Pantothenic acid	正常肉の腎臓ⓐ	16	0.072	0.4259
	青肉の腎臓ⓑ	8	0.3176	0.6215

* ⓐ: Kidney of normal yellowfin tuna
ⓑ: Kidney of green meat body.

考　　察

以上の実験の結果，腎臓の水分含量は青肉著しき個体に高く，正常個体に低く，前報に肉について観察した結果と同じ傾向を示したが，B群含量においては，前報の肉について測定した場合よりも，却つて判然としない結果になつた。

これは生体中では腎臓と肉との間にB群含量の変動は直接的連関が少いという事であるのか，或は腎臓中には種々の分解酵素が存在して，試料の鮮度により，B群の残存量が大きく影響されるためであるかもしれない。前報でのべたように本試料は南洋もののキワダであるから漁獲後相当の日数を経ており，必ずしも鮮度が一様でなかつたことも一因であると思われる。鮮度の影響をうけない水分やPにおいては肉の場合よりもはるかに明瞭な傾向が得られている事も前記の想像を裏付けるものであろう。

腎臓の B_2 と葉酸の含量が青肉個体において比例的変化を示し，正常個体において全くそれがみれられない理由については今後種々の知見を綜合しなければ，簡単には説明し得ない事柄であろうが，前報の肉についても全く同じ傾向が得られている点から考えてこの結果は必しも単なる偶然ではないであろう。或はこの辺から青肉の成因の生化学的解明の糸口がつけられるのではなかろうか。

摘　　要

キワダ腎臓のB群と無機質の含量を測定し，青肉個体の腎臓は正常個体に比し水分が多く，Pが少ないことを見出し，特に P/Ca が青肉個体に於て小さいことを認めた。

腎臓のB群含量と青肉との間には関係が認められなかつたが，青肉著しき個体群に於ては腎臓の B_2 と葉酸が比例的に変化しており，正常肉群に於てはかかる関係がないという結果を得た。このことは前報で肉について得た結果と同様であり，青肉の成因の解明へ今後の手掛りとなるであろう。

本研究に当り終始御指導を頂いた東秀雄博士ならびに実験に協力せられた大同水産株式会社に厚く謝意を表する。

文　　献

1) 著者等: 本誌，**24**，pp. 671～675 (1958)

マグロ青肉に関する研究—Ⅲ.

青肉個体の簡易判別法(予報)

平尾秀一・村山繁雄・簗瀬正明
山田充阿弥・菊地 嶺・田部井菊子
(東海区水産研究所)

木坂健次・榎本吉宏
(日本輸出冷凍水産物検査協会)

Study on the Green Meat of Tuna—III.

A Simple Method to Distinguish Greened Body from Normal One before Cooking.

Shuichi Hirao, Shigeo Murayama, Masaaki Yanase,
Juami Yamada, Ryo Kikuchi and Kikuko Tabei
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

Kenji Kisaka and Yoshihiro Enomoto
(Japan Export Frozen Marine Product Inspection Cooperation)

No particular method has been known so far to distinguish the individuals with green meat among catches of yellowfin tuna, because the abnormality becomes apparent only through the process of precooking. According to the authors' findings, however, water suspension of kidney tissue is colored light brown in the case of normal body, and brownish black in with greened body, showing a color graduation in good agreement with that of precooked meat.

On the basis of the findings it is suggested that greened body can be easily distinguished from the normal one by judging the color of kidney suspension.

Table 2 shows prescriptions of color standard applicable to such inspection.

緒 言

前報[1),2)]においてキワダの青肉個体と正常個体につき成分の異同を検したが，たまたまその実験中，青肉個体の腎臓組織の色が正常個体のそれに比し，著しく黒味を帯びていること，殊に組織を磨砕して水に懸濁した色調に顕著な差のあること，この色調は正常肉の個体に於ては明褐色，青肉著しきものに於ては黒褐色であり，青肉の程度に応じて段階的な変化がみられることに気付き，この現象を利用して簡単に青肉の判定ができる予想を得たので玆に発表する。

実験及び結果

1) 腎臓組織懸濁液の色調

試料魚（キワダ）は前報の実験に用いたものと同じである。腎臓は約 10g を乳鉢で磨砕し，その 1g を小型フラスコにとり，水 50cc を加え振りまぜる。この液の色調を Table 1 及び Fig. 2 に示した。表中

1958 年 9 月 29 日受理
東海区水産研究所業績B第 301 号

Table 1. The relation between the color of precooked tuna meat and that of water suspension of the kidney tissue.
第 1 表　キワダ蒸煮肉の色調とその腎臓懸濁液の色調との関係

Sample No.	Grade of cooked meat* 肉色の良否	Color of the suspension of kidney tissne 腎臓組織懸濁液の色調	Color standard by Japan Color Research Institute 日本色彩研究所"色の標準" 色調のカラー番号		
			Color 色相番号	Brilliance 明度番号	Hue 彩度番号
1	5.0	明るい茶 Brownish buff	5	16	4
2	5.0	明るい赤茶 Rose beige	3	16	3
3	4.5	明るい茶 Light brown	5	16	3.5
4	4.4	明るい茶 Brownish buff	5	16	4
5	4.3	明るい茶 Brownish buff	5	16	4
7	4.3	朽葉色 Russet brown	5	14	4
8	4.1	赤茶 Reddish brown	3	14	5
9	3.9	赤茶 Reddish brown	3	14	5
10	3.6	赤茶 Ochre Red	2	14	5
11	3.6	茶色 Brown	4	14	4
12	3.4	うす赤茶 Pale reddish brown	3	16	3
13	3.3	うす赤茶 Pale reddish brown	3	16	3
14	3.3	うす茶 Pale brown	5	17	3
15	3.1	うす茶 Pale brown	5	17	3
17	3.0	うす赤茶 Terra cotta	4	16	4
18	2.7	赤茶 Reddish brown	3	14	5
19	2.6	暗い茶 Dark brown	4	12	3
20	2.1	暗い茶 Dark brown	4	12	3
22	1.9	茶黒 Brownish black	4	11	1
23	1.9	茶黒 Brownish black	4	11	1
24	1.7	茶黒 Brownish black	4	11	1
25	1.6	暗い茶 Dark brown	4	12	3
26	1.1	黒 Black	0	10	0
27	1.1	灰黒 Grayish black	0	11	0
29	1.0	茶黒 Brownish black	5	11	1
30	1.0	茶黒 Brownish black	4	11	1

* See footnote of Table 1, Report I for explanation.

「肉色の良否」欄の数値は第 I 報にのべた如く，肉色が淡いピンク色を呈し本実験の試料中で最も良質とみられたものを 5 点，反対に最も青色の著しいものを 1 点として評点することに定め，数名が独立に採点した平均値である。

懸濁液の色調の表現は日本色彩研究所発行の「色の標準」に依つたが，肉色良好のものの腎臓懸濁液は明るい褐色系統の色調を示し，肉色やや劣るものに於ては，次第に赤味を帯びた色調となり，更に肉色が不良のものになるほど液色は黒褐色が強くなり，本実験の 26 例の結果では両者は完全な対応を示した。なお表には同書のカラー番号を附記した。なおこの液の黒色度は主として水不溶性のメラニン様黒色物質の存在によるもので，液を遠沈すると上澄は淡黄色となり，上澄液においては正常肉と青肉との間に著しい差違は認められなかつた。

2) 懸濁液を透明溶液とする試み

懸濁液中の不溶物を何らかの方法で溶解して，透明溶液となし，吸収スペクトルの測定値を以て濃淡を表そうと試みたが，液中のメラニン様黒色物質はエーテル，アセトン，ピリジン等に不溶であり，10% NaOH

Fig. 1　キワダ煮者肉の色調を示す。左：青肉，右；正常肉。
Color of precooked yellow—fin tuna. Left : green, right : normal.

Fig. 2　キワダ腎臓の水懸濁液。左2個；青肉，中央2個及び右の2個は正常肉。
Color of water suspension of kidney of yellow—fin.
Left two: kidney of greened body. Middle two and right two: normal.

Fig. 3　各種標準液の1例（活性炭，Fe_2O_3，CdS を配合）

Table 2. Prescriptions for color standard for detecting the green meat of tuna before cooking.

第2表　色調標準液の処法例

Color of composite suspendions	Color Standard 色調のカラー番号			Composition of color suspensions 色素液の配合割合					
	Color 色相番号	Brilliance 明度番号	Hue 彩度番号	a*	a′	b	c	d	water
				cc	1cc	2cc	8cc	3cc	3cc
明るい茶 Brownish buff	5	16	4						
うす赤茶 Pale reddish brown	3	16	3		1	2		10	20
朽葉色 Russet brown	5	14	4		2	2	4	8	
赤　茶 Reddish brown	3	14	5		3	6			12
茶　色 Brown	4	14	4		3	2	4		10
うす茶 Pale brown	5	17	3		1	1	2	16	4
明るい茶 Brownish buff	4	16	4		2	1		12	6
暗い茶 Dark brown	4	12	3	1		4			6
茶　黒 Brownish black	5	11	1	4		2			6
黒　 Black	0	10	0	2				6	6
灰　黒 Grayish black	0	11	0	2				16	

* note: a; Carbon black 1gr + 40cc water　　c; Zinc Chromate 0.1gr + 80cc water
a′; a 1cc + 80 〃　　d; Diatom earth 1gr + 80 〃
b; Fe_2O_3 0.5gr + 60 〃

を用いれば，ほぼ溶解し得るが，その液の色調は各試料共似たものとなり，懸濁液の場合よりも色調の差が遙かに少くなるので，色調の比較には不適当である。

3) 色調標準液を調製する試み

前記の方法により調製した懸濁液の色調を安定な物質を以て再現し標準液を調製することを試みた。即ち Table 2 に示すごとく活性炭，珪藻土，クロム酸亜鉛，酸化第二鉄の水懸濁液を製し，これらを適宜混合して，本実験の腎臓懸濁液の色調を模した液を調製した。この試みは手近の材料を用いて行つたもので必しもこれが最上の標準液処法とはいえないであろうが，実際の検査等の場合にも一応の處置として使用できるものと考える。

考　　察

本実験の範囲では腎臓組織懸濁液の色調と，その魚体の肉色（蒸煮後の）との間には顕著な相関が認められ，青肉の判定上に有力な手段たり得べきことが予想されたが，この現象が果して他の試料及びビンチョウ，メバチ等にも例外なく成立するかは今後更に検討を要するであろう。しかし天野ら[3]はビンチョウの蒸煮肉を観察し，肉中を走る血管の色が青肉においては著しく黒色を帯びていると述べており，又腎臓は特に血液の多い器官であること，更に青肉の色素は血色素系の蛋白色素乃至はその変性物質であろうという従来の知見[4]等と併せ考えると，本実験で観察した現象は必ずしも偶然ではないと考えられる。

摘　　要

キワダの腎臓を磨砕して水に懸濁した液の色調は，正常個体に於ては淡い褐色，青肉個体に在つては黒褐色であり，肉色の程度に応じて段階的の変化がみとめられることを見出し，この現象が青肉の簡単な判別法として利用できると考えた。

本研究に当り終始御指導を頂いた東秀雄博士ならびに実験に協力せられた大同水産株式会社に厚く謝意を表する。

文　　献

1), 2) 著者等：本誌. **24**, 671～675, 676～678 (1958)
3) 天野慶之外：静岡県缶詰協会報.
4) NAUGHTON, J. J., et. al: Special Sci. Rep. Fish. No. 177, U. S. A. (1956); *ibid.* No. 247 (1957).

魚貝類のパントテン酸含量

東　秀雄・村山繁雄・簗瀬正明・田部井菊子
（東海区水産研究所）

日本水産学会誌
第二十四巻　第九号　別冊
昭和三十四年一月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, No. 9, Jan. 1959

魚貝類のパントテン酸含量

東 秀雄・村山繁雄・簗瀬正明・田部井菊子
(東海区水産研究所)

The Pantothenic Acid Content of Fish and Shellfish

Hideo Higashi, Shigeo Murayama, Masaaki Yanase and Kikuko Tabei

The pantothenic acid (PA) content in the tissues of various kinds of fish and shellfish has been determined by microbiological assay (Skeggs, H. R. and Wright, L. D., 1944) using *Lactobacillus arabinosus* as the test microbe.

1. Among the tissues of fish so far examined, the gonad is most potent in the PA content, and both the dark colored meat and the liver rank next. Whereas, the PA level in the ordinary meat is poor except the case of flounders, whose ordinary meat contains more PA than the liver (Table 1).

2. In the common mackerel, *Scomber japonicus*, the quantitative ratios of PA in the meat (both ordinary and dark), gonad and liver to the total PA contents are about 70, 10, and 5% respectively (Table 2).

3. The individual differences of the PA content in the ordinary meat and the liver are little among the same species. It seems that the ordinary meat of fish with a greater locomotion contains PA more abundantly than that of bottom fish or less locomotive ones (Table 3).

4. The level of PA in soft parts of bivalves is generally between those in the liver and the ordinary meat of usual fish. It is worth noting that the muscle of abalone is found with very rich PA content (Table 4).

I. 緒 言

パントテン酸 (以下 PA と記す) は生体内で Coenzyme A の構成分子となつて[1] 組織細胞の基本的生化学反応に関与することが確められている。人, 白鼠, ヒナ等に於ては PA の生理作用が漸次解明されているが, 魚類に於ては魚体内 PA の生理作用を直接究明した報告は勿論, これの基礎研究も少い。McLaren 等[2] は rainbow trout の飼育試験によりビタミン B_1, B_2, PA, folic acid, niacin の欠乏症状を観察し, 且つこれ等ビタミンの必要量を定めた。rainbow trout は PA が欠乏すると club shaped gill を生じ, 餌料中 PA の適量は 1～2mg/100g であるとした。Braekkan[3] はマグロ, タラの卵巣に PA が濃厚であること, タラ卵巣の成熟に PA が深い関係があることを述べている。我々は主として魚類その他貝類について可食部, 内臓諸組織の PA 含量を測定し, 食物としての魚貝類の栄養価に関する基礎資料を提供すると共に, PA の魚体組織中に於ける分布, 魚の種類, 個体による含量の変異より魚類に於ける PA の生理的な役割について多少の推測を下した。

II. 実験材料及び方法

1. 供試料 入手した魚貝類の由来は各 Table の備考に記す通りで何れも鮮度の良好なものを試料とした。同種の魚について PA 含量の個体差を調べる場合はなるべく体長, 体重の著しく異る個体を選んだ。

2. PA の定量法 PA の定量は bioassay により, 菌株には *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8041*

1958 年 9 月 19 日受理 東海区水産研究所業績 B 第 294 号

* 応用微生物研究所から分譲をうけた。深く感謝する。

を，基本培地には SKEGGS and WRIGHT[4] による培地を用いた。菌の繁殖の測定は比濁によつた。組織から PA を抽出する際 mylase P で組織を消化した。ここに示す PA 含量はパントテン酸 Ca としての値である。

III. 実験結果及び考察

1. 魚類諸組織の PA 含量　数種の魚類について諸種組織の PA 含量を測定した。結果を Table 1 に示す。尚普通肉は脊側から採取した。各組織の PA 含量は魚により相当の差があるが，一般に PA は生殖腺に最も濃厚で血合肉と肝臓がこれに次ぎ続いて心臓に多く，普通肉には少いといえよう。生殖腺の中，卵巣

Table 1. Pantothenic acid content* in various tissues of fish (γ/g. on wet basis)

Species	Gonad	Dark meat	Liver	Heart	Pyloric caeca	Intestine	Stomach	Kidney	Spleen	Skin	Ordinary meat
ヤツメウナギ Lamprey *Entosphenus japonicus*	16(♀)		12	5				trace		trace	2.8
ウサギザメ Shark *Chimaera barbouri*	12(♂)		0.6								3.1
ウナギ Eel *Anguilla japonica*	156(♂)		38								1.4
ボラ Mullet *Mugil cephalus*	1.2(♂)		19						1.2		6.9
サバ Common mackerel *Scomber japonicus*	37(♀)	16	12	11	5.5	3	6	2	0.9		1.6
ブリ Yellow tail *Seriola quinqueradiata*			30	24	17			18	9.2	8.8	7.9
アオダイ (Aodai) *Paracaesio caeruleus*	15(♂)		16	14	7.9			5	5		0.3
マダイ Porgy *Pagrosomus unicolor*	46(♀) 3.4(♂)	18	16 16	13		12	9	trace	trace	trace	2.3 1.8
オオサガ (Ōsaga) *Sebastodes iracundus*	6.1(♀)		5.3								trace
ホオボオ Sea robin *Chelidonichthys kumu*	19(♀)		5.6	5.6				4.8	13		1.9
マガレイ Flounder *Limanda angustirostris*			3.7					5.3			17
ババガレイ Slime flounder *Microstomus stelleri*	18(♀)		1.5								4.1

* Pantothenic acid contents, indicated as calcium pantothenate, were determined on the materials digested with mylase P.

は常に肝臓よりも高い PA 含量を示したが白子では肝臓よりも PA 含量が低い場合もある。またマガレイは例外で普通肉の PA 含量は非常に大きく肝臓の数倍に当る。(本表のババガレイや，後出の他のカレイ類に於ても普通肉は肝臓より PA 含量が多い。) 魚類生殖腺が体組織中最も大きな PA 含量を有することは PA が魚の生殖腺の成熟に重要な関係があることを予測させて興味が深い。前記 BRAEKKAN によればタラ卵巣の PA 含量は成熟の初期に大で成熟するにつれて稀薄になるという。この点は今後調査したい。また PA が普通肉に比し血合肉に遙かに多く含まれることはビタミン B_1[5][6], B_2[6][7], B_{12}[8][9] と同様であつて血合肉は普通肉と異る機能を有するとの説を支持するものである。次に Table 1 中のサバを例に取つて各組織の重量と PA 含量から各組織中の PA の総量及びそれらの全体に対する割合を算出すると Table 2 の如くになる。

Table 2. Distribution of pantothenic acid in various tissues of common mackerel (*Scomber japonicus*)*

Tissue	Weight of tissue	PA content	Total amounts of PA	
	g.	γ/g.	γ	%
Ordinary meat	270	1.6	430	34
Dark meat	30	16	480	38
Gonad	4.9	37	180	14
Liver	5.4	12	65	5
Pyloric caeca	9.2	5.5	50	4
Stomach	5.2	6	30	2.4
Heart	1.6	11	18	1.4
Intestine	2.4	3	7	0.6
Spleen	0.7	0.9	6	0.5
Kidney	1.4	2	3	0.2

* Measured 500g. in body weight, obtained at Tsukiji, Tōkyō in Feb., 1958.

Table 3. Pantothenic acid content in common meat and liver of fish

Species	Body length	Body weight	Liver weight	PA content γ/g		Source of the samples
				Ordinary meat	Liver	
	cm.	g.	g.			
ヤツメウナギ Lamprey *Entosphenns japonicus*	52.5 47 47	235 190 175	5.0 2.5 4.1	4.3 5.7 2.8	14 14 12	Mogami River, Yamagata pref., Nov., 1957
ヨシキリザメ Great blue shark *Galeus glaucus*	170 160				11 10	Off Mie pref., Mar., —58
アオザメ Blue shark *Isurus glaucus*	105 95				9.3 17	Off Mie pref., Mar., —58
アブラザメ Dogfish *Squalus sucklii*	71	1455		8.6	6.4	Hachinoe, Aomori pref., Dec., —57
ウサギザメ Shark *Chimaera barbouri*	73*	1340		3.1	0.6	Hachinoe, Dec., —57
ビロオドザメ Shark *Scymnodon squamulosus*	36	500		1.1	0.7	Hachinoe, Dec., —57
イワシ Sardine *Sardinops melanosticta*	18, 18.5	74, 77		10	15	Tsukiji, Tōkyō, Sept., —57
マス Pink salmon *Salmo milktschitsch*	42 38 30	1225 840 435	 16.5 13.8		16 13 12	Sado Island, Niigata Pref., Mar., —58
アユ (Ayu) *Plecoglossus altivelis*	14～16 (3)** 10.5～12 (6)	40～68 12～23	1.3△ 0.4△	14 10	58 42	Sagami River, Kanagawa pref., Aug., —57
ナマズ Freshwater catfish *Parasilurus asotus*	31.5 23.5 21.5	275 140 110	5.3 2.3 1.7	3.2 6	10 19 11	Sagami River, Aug., —57
ウナギ Eel *Anguilla japonica*	52* 32*, 34* 58* 40*, 42*	283 38, 47 270 88, 87	3.5 1.4△ 3.6△ 2.8△	0.9 1.2 1.4 1.5	7.6 12 38 27	Cultured in Hamana Lake, Shizuoka pref., Gifu pref., Dec., —57 Dec., —57
サンマ Saury *Cololabis saira*	29, 30.5	122, 150		8.5	13	Tsukiji, Sept., —57
ボラ Mullet *Mugil cephalus*	32.5 26	592 285	12.5 5.7	6.9 8.3	19 19	Tsukiji, Sept., —57
サバ Common mackerel *Scomber japonicus*	27.5 20 32 30 24 34 29	325 120 500 460 210 785 405	3.5 1.7 7 3 8 9.5	3.0 3.2 1.6	28 15 12 18 18 18 14	Manazuru, Kanagawa pref., July, —57 Tsukiji, Feb., —58 Itō, Kanagawa pref., Mar., —58 Shimoda, Kanagawa pref., Mar., —58
ブリ Yellow tail *Seriola quinqueradiata*	47.5 45 27.5	2100 1360 340	32.5 15.8 4.0	4.6 7.9 5.2	31 30 24	Manazuru, July, —57 Tsukiji, Aug., —57
アジ Jack mackerel *Trachurus trachurus*	24 10～14.5 (6)	237 16～48.5	2.1 0.2△	2.0 5.0	8.7 14	Manazuru, July, —57
アオダイ (Aodai) *Paracaesio caeruleus*	38.5 25.5	1310 430	7.5 4.3	0.3 1.3	16 8.5	Tsukiji, Sept., —57
アラ Deep sea bass *Niphon spinosus*	50.5 42	2500 1300	37 17		13 11	Inatori, Kanagawa pref., March, —58
マハタ Common grouper *Epinephelus septemfasciatus*	30 22	859 275	9.5 3.5		12 6.2	Ōshima Island, Tōkyō, Mar., —58
イサキ (Isaki) *Parapristipoma trilineatum*	27.3 16, 17.5 12～13 (3)	505 95, 130 37～48	8.4 2.5△ 1.1△	3.6 1.9 2.6	15 16 14	Manazuru, July, —57

Species	Body length cm.	Body weight g.	Liver weight g.	PA content γ/g Ordinary meat	PA content γ/g Liver	Source of the samples
マダイ Porgy *Pagrosomus unicolor*	30 15.5～16 (3)	750 115～120	13.9 2.2△	2.3 1.8	16 16	Tsukiji, Nov., 1957
キダイ Yellow sea bream *Taius tumifrons*	18 11.5	210 76	1.5 1.0		4.7 18	Inatori, Mar., —58
ウミタナゴ Surf perch *Ditrema temminki*	19 16	245 170	3.5 2.0		13 14	Shimoda, Mar., —58
ベラの類 Wrasse	24 18.5	340 155	3 1.8		17 19	Shimoda, Mar., —58
ブダイ Parrot fish *Leptoscarus japonicus*	25 20.5	510 240	16 4		9.9 12	Shimoda, Mar., —58
ウマヅラ File fish *Cantherines unicornu*	23.5 20.5	310 230			7.9 3.1	Itō, Mar., —58
キチジ Rock fish *Sebastolobus macrochis*	24.5 20.5	460 210		0.8 1.0	2.8 1.1	Hachinoe, Dec., —57
アコオ Red rock cod *Sebastodes matsubarae*	30 22.5	640 310	7.5 9.0		16 8	Inatori, Mar., —58
オオサガ (Ōsaga) *Sebastodes iracundus*	48 30	3100 940		trace 1.5	5.3 2.8	Hachinoe, Dec., —57
アヤメカサゴ Rock cod *Sebastiscus albofasciatus*	38 26	1410 440	3 1.5		14 11	Inatori, Mar., —58
ホッケ Atka mackerel *Pleurogrammus monopteryguis*	32.5 31	780 495		1.9 1.8	11 9	Hachinoe, Dec., —57
アオカジカ Muddler *Myoxocephalus nivosus*	25 17	430 110		0.8 1.2	5.3 2.6	Hachinoe, Dec., —57
ホオボオ Sea robin *Chelidonichthys kumu*	42 28.5	1150 410	22.5 8	1.9 2.6	5.6 6.1	Hachinoe, Dec., —57
アカガレイ Flat head flounder *Hippoglossoides elassodon*	35 30	600 400		0.8 2.3	2.1 1.4	Hachinoe, Dec., —57
アブラガレイ Arrow toothed halibut *Reinhardtius matsuurae*	48 30.5	2330 510		8.9 2.8	0.8 3.0	Hachinoe, Dec., —57
マガレイ Flounder *Limanda angustirostris*	34.5 25	875 405	25.9 7.6	17 10	3.7 4.3	Tsukiji, Sept., —57
サメガレイ Shark-skin flounder *Clidoderma asperrimum*	36 27.5	1430 595 350 225		9.4 6.7	2 2.4 6.4 13	Hachinoe, Dec., —57 Onahama, Fukushima pref., Mar., —58
ババガレイ Slime flounder *Microstomus stelleri*	33 24	860 260		4.1 10	1.5 1.5	Hachinoe, Dec., —57
ハゼ Spiny goby *Acanthogobius flavimanus*	12～14 (5) 6～7.5 (5)	29～46.5 6.1△	2.0△ 0.2△	1.9 2.0	5.1 3.0	Sunamachi, Tōkyō, Sept., —57
ハタハタ Sand fish *Arctoscopus japonicus*	14～17 (3)	130△	2.8△	6.3	9.2	Tsukiji, Dec., —57
タラ Cod fish *Gadus macrocephalus*	48 30.5	600 400		1.0 1.8	2.3 3.3	Hachinoe, Dec., —57
スケトウ Alaska pollack *Theragra chalcogramma*	32.4 27	465 265		1.0 1.8	3.6 4.2	Hachinoe, Dec., —57

* Total length.

** Numerals in parentheses indicate the number of fish.

△ Average weight.

筋肉（普通肉，血合肉）の重量は体重の6割とし，筋肉の1割を血合肉と看做した。頭部，骨等は計算から除いてあるにしてもPAは体組織中，筋肉に多量に存することは明瞭であつて，全魚体中のPA総量のおよそ7割が筋肉に含まれていると見られる。筋肉に次いで卵巣に多く分布し，以下肝臓，幽門垂の順になる。

2. 諸種魚類の肉及び肝臓の PA 含量　諸種の魚類について測定した普通肉及び肝臓の PA 含量を Table 3 にまとめた。前表に含まれる魚類の肉，肝臓の値をも便宜上この表に入れた。

a. 魚肉の PA 含量　同種の魚類では魚の大さ（或いは年齢）が違つても，且つ採集地が異つても肉の PA 含量の個体差は少く2倍以上の例は小数に過ぎない。この現象はビタミン B_6[10] 等と同様である。しかし魚の種類が違えば肉の PA 含量は相当に差異があり，カレイ類等小数の例外はあるが，概してイワシ，アユ，サンマ，ボラ等活動性の大なる魚類はキチジ，オオサガ，アオカジカ，ホオボオ等活動性の小なる魚類（底魚又は定着魚）に比し肉の PA 含量が大きい。この現象も niacin[6]，ビタミン B_6[11)10)] と共通している。以上の事実は PA が魚の成長に直接の関係を持つビタミンではなく主として新陳代謝に関与するビタミンであつて，従つて魚の大さに拘らず体内に一定の必要量だけ保有されること，及び活動性の大なる魚類は然らざる魚類に比べて多量の PA を体内に保持することを示すものである。

b. 魚類肝臓の PA 含量　肝臓に於ても同種の魚では魚の大小による PA 含量の個体差は少い。また魚種が異れば肝臓の PA 含量も相当の差異を示すが，魚の活動性の大小と PA 含量との間に明らかな傾向は見出し難い。ただ底魚は肝臓の PA 含量が概して小さい。

3. 貝類の PA 含量　二枚貝については貝殻を除いた軟体部全体，巻貝については軟体部の中，筋肉，肝臓，生殖腺の PA 含量を測定した。結果を Table 4 に示す。ハマグリ，アサリ等二枚貝軟体部の PA 含量は貝の種類による差が少く，含量の大さは一般の魚類肝臓よりは小で魚肉より稍々濃い程度である。巻貝の PA について目立つことはアワビの筋肉に PA が濃厚なことで，その含量は生殖腺，肝臓を遥かに凌ぎ PA 含量の高い部類の魚類肝臓と同程度である。アワビの生殖腺が肝臓より高い PA 含量を有することは魚類の場合と同じである。

Table 4. Pantothenic acid content in shell fish

Species	Number of shellfish	Mean body weight g.	Weight of soft part g.	PA content γ/g. Soft part	Muscle	Liver	Gonad	Source of the samples
アカガイ Bloody clam *Anadara broughtoni*	2	74		7.9				Urayasu, Chiba pref., Sep., 1957
シジミ Fresh water clam *Corbicula japonica*	20	3.6		3.6				
ハマグリ Hard clam *Meretrix meretrix lusoria*	8	11.2		5.3				
アサリ Baby clam *Tapes japonica*	10	7.2		5.5				
アワビ(クロ) Abalone *Haliotis discus*	1		22		30	5.9	10	Enoshima, Kanagawa pref., Dec., —57
アワビ(メガイ) Abalone *Haliotis sieboldi*	1		28.5		23	3.9	13	
サザエ Top shell *Turbo cornutus*	1		43		2.6	5.5		

IV. 摘　　要

魚貝類体組織中の PA を bioassay により定量し，次の結果を得た。

1. 一般に PA は魚類体組織中，生殖腺に最も濃厚で血合肉，肝臓がこれに次ぎ，普通肉には少い。

2. サバの体組織に於ける PA の分布割合を見ると筋肉（普通肉，血合肉）中の PA 総量は全体の PA 総量の約7割を占め以下卵巣，肝臓，幽門垂の順になる。

3. 同種の魚類では魚の大小による PA 含量の個体差は肉に於ても肝臓に於ても少い。
4. 概して，活動性の大きな魚類は活動性の小さい魚類に比し肉の PA 含量が高い。
5. 二枚貝軟体部の PA 含量は魚類の肉と肝臓の中間程度である。アワビの筋肉には PA が濃厚である。

文　　献

1) Lipmann, F., Kaplan, N. O., Novelli, G. D., Tuttl, L. C. and Guirard, B. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 869 (1947).
2) Mc Laren, B. A., Keller, E., Donnell, D. J. and Elvehjem, C. A.: *Arch. Biochem.* **15**, 169 (1947).
3) Braekkan, O. R.: *Nature*, **176**, 598 (1955).
4) Skeggs, H. R., and Wright, L. D.: *J. Biol. Chem.*, **156**, 21 (1944).
5) 児玉豊治：動物及び植物，**6**，1198 (1938).
6) 森高次郎・橋本芳郎・小俣　靖：本誌，**21**，1233 (1956).
7) 藤田秋治：医学と生物，**3**，418 (1943).
8) 簗瀬正明：本誌，**17**，389 (1952).
9) 橋本芳郎・山田茂英・森高次郎：本誌，**19**，135 (1953).
10) 簗瀬正明：本誌，**22**，51 (1956).
11) M. Miyake, and K. Hayashi: *Report of Facul. Fish., Pref. Uni. Mie*, **1**, no. 3 (1954).

魚貝類の葉酸含量

東　秀雄・村山繁雄・簗瀬正明・田部井菊子
（東海区水産研究所）

日本水産学会誌
第二十四巻　第九号　別冊
昭和三十四年一月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, No. 9, Jan. 1959

魚貝類の葉酸含量

東 秀雄・村山繁雄・簗瀬正明・田部井菊子
(東海区水産研究所)

The Folic Acid Content of Fish and Shellfish

Hideo Higashi, Shigeo Murayama, Masaaki Yanase
and Kikuko Tabei

Microbiological estimation (Teply, L. J. and Elvehjem, C. A., 1945) of the amounts of folic acid (FA) has been carried out by the use of *Streptococcus faecalis* as the test microbe. The specimens of fish used in the present study were almost the same that were delt with in the preceding work for the pantothenic acid content. From the results shown in the tables it has been revealed that:

1. This member of vitamin is abundantly held in visceral tissues of fish, especially in the liver, kidney, and spleen, but low in the meat (Table 1).

2. In the common mackerel, *Scomber japonicus*, the quantitative ratios of FA in the liver and the meat to the total in all tissues are about 30 and 20%, respectively (Table 2).

3. Among the same species, the individual difference of the FA content is not appreciable in the ordinary meat, but occasionaly large in the liver. A group of fish with large locomotive power generally stores more FA in the liver than the other less locomotive or living on the bottom (Table 3).

4. Apparently there are two groups of fish showing parallelism between the FA content and the pantothenic acid content in the body. One group when they hold a larger amount of pantothenic acid in the meat than the other, they also show a higher level of FA in the liver and/or in the meat than the other (Table 4).

5. The level of FA in the soft parts of bivalves is generally between those in the liver and the ordinary meat of fish with a moderate FA potency. The liver of top shell, *Turbo cornutus*, contains FA at an extremely high level (Table 5).

I. 緒 言

葉酸 (以下 FA と記す) は生体内で赤血球の生成に関与するビタミンで構造が確定された[1]のは比較的らしい。著者等のパントテン酸に関する報告[2]と同様の趣旨より諸種魚類，貝類の体織組中の FA 含量を定した。

II. 実験材料及び方法

1. 供試料 供試料の大部分はパントテン酸の測定に用いた魚貝類と同じものである。

2. FA の定量法 FA の定量は bioassay によつた。菌株は *Streptococcus faecalis* ATCC 8043* 基本培地は Teply and Elvehjem[3] の培地を用い，菌の繁殖は比濁によつて測定した。組織の消化には の腎臓を使用した。ここで謂う FA とは *S. faecalis* の growth factor のことで，pteroyl glutamic ac とその類縁物質を含む。

1958 年 9 月 19 日受理 東海区水産研究所業績 B 第 295 号

* 応用微生物研究所から分譲をうけた。深く感謝する。

Table 1. Folic acid content* in various tissues of fish (γ/100g. on wet basis)

Species	Liver	Kidney	Spleen	Intestine	Stomach	Gonad	Pyloric caeca	Heart	Skin	Dark meat	Ordinary meat
ヤツメウナギ Lamprey *Entosphenus japonicus*	574	53				55 (♀)		45	28		24
ウサギザメ Shark *Chimaera barbouri*	74					5.7 (♂)					2.7
ウ ナ ギ Eel *Anguilla japonica*	55	70							7.6		10
ボ ラ Mullet *Mugil cephalus*	375	69	59					20			11
サバ Common mackerel *Scomber japonicus*	186	146	132	62	31	15 (♀)	52	16		5.8	1.9
ブ リ Yellow tail *Seriola quinqueradiata*	170	123	65				59	63	6.7		3.2
アオダイ (Aodai) *Paracaesio caeruleus*	275	65	250			116 (♂)	40	22			1.1
マ ダ イ Porgy *Pagrosomus unicolor*	42	73	58	53	16	31 (♀)		14		0.7	0.4
ホオボオ Sea robin *Chelidonichthys kumu*	69	112	340			95 (♀)		22			1.4
マガレイ Flounder *Limanda angustirostris*	166	285	200						6		1.0

* Folic acid contents were determined on the materials digested with enzyme of pig kidney.

III. 実 験 結 果

1. 魚類諸組織の FA 含量　諸種魚類の各体組織の FA 含量は Table 1 に示す如くで，一般に FA は内臓特に肝臓，腎臓，及び脾臓に多く，普通肉，血合肉には少い。肝臓と普通肉の FA 含量の差は数十倍に達し，パントテン酸の場合に比べその差は著しい。

次にサバの体組織中に於ける FA の分布を見ると Table 2 の如く筋肉(普通肉，血合肉)に存する FA 量は全体の約 2 割であるのに対し，肝臓の FA 量は約 3 割を占める。FA はパントテン酸に比べると魚体中肝臓に多く集中していることが分る。

Table 2. Distribution of folic acid in various tissues of common mackerel (*Scomber japonicus*)

Tissue	Weight of tissue	FA content	Total amount of FA	
	g.	γ/100g.	γ	%
Liver	5.4	186	10	35
Ordinary meat	270	1.9	5.1	18
Dark meat	30	5.8	1.7	6
Pyloric caeca	9.2	52	4.8	17
Kidney	1.4	146	2.0	7
Stomach	5.2	31	1.6	5.6
Intestine	2.4	62	1.5	5.3
Spleen	0.7	132	0.9	3.2
Gonad	4.9	15	0.7	2.4
Heart	1.6	16	0.3	1

2. 魚肉の FA 含量　普通肉の FA 含量は Table 3 に見られる如く，同種の魚では総じて個体差の少いことパントテン酸と同様である。魚種が違えば肉の FA 含量はかなりの相違を示すも魚の環境・習性と肉の FA含量の大さとの関連は明確でない。測定した魚類の中では，ヤツメウナギ，ウナギ，ボラ，ハゼに多かつた。

3. 魚類肝臓の FA 含量　Table 3 に見る如く，肝臓の FA 含量は同様の魚でも魚の大小による個体差が大きい場合が屢々あり，その差は 5 倍に達するが，大魚と小魚との肝臓中 FA 含量の大さの順位は一定しない。アユ，ウナギ(養殖)，アジ，アラ，マダイ，ホオボオ，タラ等では魚体の小なる方が，大なる方より FA 含量が高いが，ウナギ (天然)，サバ，マハタ，ウミタナゴ，アヤメカサゴ，サメガレイ (小名浜産) 等では逆の傾向を示す。又魚種による肝臓の FA 含量の差異は相当に大きく，概して活動性の大きな魚類例えばイワシ，サンマ，イサキ等 (主として回游魚) は活動性の小さな魚類例えばアラ，ウマヅラ，キチジ等 (底魚又は定着魚) に比し肝臓の FA 含量が高いということが出来よう。ヤツメウナギは肝臓にも FA が多い。

4. 魚類のパントテン酸含量と FA 含量の関係　前報でパントテン酸含量を測定した魚類の中から肉

Table 3. Folic acid content in common meat and liver of fish

Species	Body length	Body weight	Liver weight	FA content γ/100g		Source of the samples
				Ordinary meat	Liver	
	cm.	g.	g.			
ヤツメウナギ Lamprey *Entosphenus japonicus*	52.5 47 47	235 190 175	5.0 2.5 4.1	24 29 18	574 407 537	Mogami River, Yamagata pref., Nov., 1957
ヨシキリザメ Great blue shark *Galeus glaucus*	160				155	Off Mie pref., Mar., —58
アオザメ Blue shark *Isurus glaucus*	105 95				40 55	
アブラザメ Dogfish *Squalus sucklii*	71	1455		3.2	96	Hachinoe, Aomori pref., Dec., —57
ウサギザメ Shark *Chimaera barbouri*	73*	1340		2.7	74	
ビロオドザメ Shark *Scymnodon squamulosus*	36	500		2.3	32	
イワシ Sardine *Sardinops melanosticta*	18, 18.5	74, 77		2	600	Tsukiji, Tōkyō, Sept., —57
マス Pink salmon *Salmo milktschitsch*	42 38 30	1225 840 435	 16.5 13.8		40 85 90	Sado Island, Niigata pref., Mar., —58
アユ (Ayu) *Plecoglossus altivelis*	14～16 (3)** 10.5～12 (6)	40～68 13～23	1.3△ 0.4△	5 7.6	176 333	Sagami River, Kanagawa pref., Aug., —57
ナマズ Freshwater catfish *Parasilurus asotus*	31.5 23.5 21.5	275 140 110	5.3 2.3 1.7	1.4 2.4	116 65 110	
ウナギ Eel *Anguilla japonica*	52* 32*, 34* 58* 40*, 42*	283 38, 47 270 88, 87	3.5 1.4△ 3.6 2.8△	10 6.3 21 15	55 115 390 107	Cultured in Hamana Lake, Shizuoka pref., Dec., —57 Gifu pref., Dec., —57
サンマ Saury *Cololabis saira*	29, 30.5	122, 150		6.4	540	Tsukiji, Sept., —57
ボラ Mullet *Mugil cephalus*	32.5 26	592 285	12.5 5.7	11 6	375 270	
サバ Common mackerel *Scomber japonicus*	27.5 20 32 30 24 34 29	325 120 500 460 210 785 405	3.5 1.7 7 3 8 9.5	1.7 1.9 1.9	150 121 186 130 27 520 24	Manazuru, Kanagawa pref., July., —57 Tsukiji, Feb., —58 Itō, Kanagawa pref., Mar., —58 Shimoda, Kanagawa pref., Mar., —58
ブリ Yellow tail *Seriola quinqueradiata*	47.5 45 27.5	2100 1360 340	32.5 15.8 4.0	6.1 3.2 1.7	190 170 220	Manazuru, July., —57 Tsukiji, Aug., —57
アジ Jack mackerel *Trachurus trachurus*	24 10～14.5 (6)	237 16～48.5	2.1 0.2△	1.8 2.0	188 500	Manazuru, July, —57
アオダイ (Aodai) *Paracaesio caeruleus*	38.5 25.5	1310 430	7.5 4.3	1.1 1.2	275 200	Tsukiji, Sept., —57
アラ Deep sea bass *Niphon spinosus*	50.5 42	2500 1300	37 17		16 90	Inatori, Kanagawa pref., Mar., —58
マハタ Common grouper *Epinephelus septemfasciatus*	30 22	859 275			150 50	Ōshima Island, Tōkyō, Mar., —58
イサキ (Isaki) *Parapristipoma trilineatum*	27.3 16, 17.5 12～13 (3)	505 95, 130 37～48	8.4 2.5△ 1.1△	6.7 1.7 2.1	430 748 664	Manazuru, July, —57

Species	Body length cm.	Body weight g.	Liver weight g.	FA content γ/100g Ordinary meat	FA content γ/100g Liver	Source of the samples
マダイ Porgy *Pagrosomus unicolor*	30	750	13.9	0.4	42	Tsukiji, Nov., 1957
	15.5～16 (3)	115～120	2.2Δ	0.5	220	
ウミタナゴ Surf perch *Ditrema temmincki*	19	245	3.5		210	Shimoda, Mar., —58
	16	170	2.0		87	
ベラの類 Wrasse	24	340	3		270	
	18.5	155	1.8		160	
ブダイ Parrot fish *Leptoscarus japonicus*	25	510	16		165	
	20.5	240	4		125	
ウマヅラ Filefish *Cantherines unicornu*	23.5	310			33	Itō, Mar., —58
	20.5	230			52	
キチジ Rockfish *Sebastolobus macrochis*	24.5	460		0.6	44	Hachinoe, Dec., —57
	20.5	210		1.2	35	
アコオ Red rock cod *Sebastodes matsubarae*	30	645	7.5		80	Inatori, Mar., —58
	22.5	310	9.0		31	
オオサガ (Ōsaga) *Sebastodes iracundus*	48	3100		0.4	17	Hachinoe, Dec., —57
	30	940		0.4	33	
アヤメカサゴ Rock cod *Sebastiscus albofasciatus*	38	1410	3		320	Inatori, Mar., —58
	26	440	1.5		153	
ホッケ Atka mackerel *Pleurogrammus monopteryguis*	32.5	780		4.7	173	Hachinoe, Dec., —57
	31	495		10	350	
アオカジカ Muddler *Myoxocephalus nivosus*	25	430		2.8	55	
	17	110		3.5	36	
ホオボオ Sea robin *Chelidonichthys kumu*	42	1150	22.5	1.4	69	
	28.5	410	8	2.2	366	
アカガレイ Flat head flounder *Hippoglossoides elassodon*	35	600		2.2	15	
	30	400		3.9	13	
アブラガレイ Arrow toothed halibut *Reinhardtius matsuurae*	48	2330		2.5	35	
	30.5	510		3.2	39	
マガレイ Flounder *Limanda angustirostris*	34.5	875	25.9	1.0	166	Tsukiji, Sept., —57
	25	405	7.6	3.0	293	Tōkyō,
	6.5, 8.0	7, 15	0.2	11	325	Sunamachi, Sept., —57
	36	1430		3.5	112	Hachinoe, Dec., —57
サメガレイ Shark-skin flounder *Clidoderma asperrimum*	27.5	595		2.4	127	Onahama, Fukushima
		350			385	pref., Mar., —58
		225			130	
ババガレイ Slime flounder *Microstomus stelleri*	33	860			40	Hachinoe, Dec., —57
	24	260		4.0	57	
ハゼ Spiny goby *Acanthogobius flavimanus*	12～14 (5)	29～46.5	2.0Δ	10	162	Sunamachi, Sept., —57
	6～7.5 (5)	6.1Δ	0.2Δ	11	244	
ハタハタ Sand fish *Arctoscopus japonicus*	14～17 (3)	130Δ	2.8Δ	7.8	587	Tsukiji, Dec., —57
タラ Codfish *Gadus macrocephalus*	48	600		2.3	6.3	Hachinoe, Dec., —57
	30.5	400		11	84	
スケトウ Alaska pollack *Theragra chalcogramma*	32.4	465		2.7	80	
	27	265		3.5	50	

* Total length.
** Numerals in parentheses indicate the number of fish.
Δ Average weight.

(普通肉) のパントテン酸含量が特に高い種類7種と特に低い種類5種を選び，肉のパントテン酸含量と共に肝臓及び肉の FA 含量を併記すると Table 4 が得られる。

肉にパントテン酸含量の高い魚類は肝臓又は肉の FA 含量も多い傾向が見られる。パントテン酸は魚体組織中，肉に多く分布し，FA は肝臓及び肉に多く分布するから魚体中にパントテン酸を多量に含有する魚類

Table 4. Relation between pantothenic acid content and folic acid content in fish

Species	PA content in ordinary meat γ/g.	FA content γ/100g. Liver	FA content γ/100g. Ordinary meat
ヤツメウナギ Lamprey *Entosphenus japonicus*	4.3 5.7 2.8	574 407 537	24 29 18
イワシ Sardine *Sardinops melanosticta*	10	600	2
アユ (Ayu) *Plecoglossus altivelis*	14 10	176 333	5 7.6
サンマ Saury *Cololabis saira*	8.5	540	6.4
ボラ Mullet *Mugil cephalus*	6.9 8.3	375 270	11 6
ブリ Yellow tail *Seriola quinqueradiata*	4.6 7.9 5.2	190 170 220	6.1 3.2 1.7
ハタハタ Sand fish *Arctoscopus japonicus*	6.3	587	7.8
アオダイ (Aodai) *Paracaesio caeruleus*	0.3 1.3	275 200	1.1 1.2
マダイ Porgy *Pagrosomus unicolor*	2.3 1.8	42 220	0.4 0.5
キチジ Rock fish *Sebastolobus macrochis*	0.8 1.0	44 35	0.6 1.2
オオサガ (Ōsaga) *Sebastodes iracundus*	trace 1.5	17 33	0.4 0.4
アオカジカ Muddler *Myoxocephalus nivosus*	0.8 1.2	55 36	2.8 3.5

は FA をも豊富に含むということになろう。

5. 貝類の FA 含量 Table 5 に示されるように二枚貝軟体部の FA 含量は一般魚類の肉と肝臓の FA 含量の中間に位する。巻貝に於ても魚類の如く FA は内臓に多く筋肉に少い。サザエの肝臓は非常に高い FA 含量を示し，その値は魚貝類肝臓の中で最大である。

IV. 摘　　要

魚貝類体組織中の FA を bioassay により定量し，次の結果を得た。

1. 魚類体組織中 FA は内臓特に肝臓，腎臓，脾臓に濃厚で普通肉，血合肉には少い。

2. サバの体組織中に於ける FA の分布割合は肝臓が最も多くて全体の約 3 割，筋肉（普通肉，血合肉）は約 2 割である。

3. 同種魚類に於ける FA 含量の個体差は肉では少いが，肝臓では大きい場合がある。

4. 活動性の大なる魚種は活動性の小なる魚種に比し概して肝臓の FA 含量が高い傾向がある。

5. 魚体中にパントテン酸を多量に含有する魚類は FA をも多く含むようである。

6. 二枚貝軟体部の FA 含量は魚類の肉と肝臓の中間の値を示す。サザエ肝臓は非常に高い FA 含量を有す。

Table 5. Folic acid content in shellfish

Species	Number of shell-fish	Mean body weight g.	Weight of soft part g.	FA content γ/100g. Soft part	Muscle	Liver	Gonad	Source of the samples
アカガイ Bloody clam *Anadara broughtoni*	2	74		17				Urayasu, Chiba pref., Sept., 1957
シジミ Fresh water clam *Corbicula japonica*	20	3.6		17				
ハマグリ Hard clam *Meretrix meretrix lusoria*	8	11.2		11				
アサリ Baby clam *Tapes japonica*	10	7.2		26				
アワビ(クロ) Abalone *Haliotis discus*	1		22		5	98	58	Enoshima, Kanagawa pref., Dec., —57
アワビ(メガイ) Abalone *Haliotis sieboldi*	1		28.5			78	90	
サザエ Top shell *Turbo cornutus*	1		43		7.3	1460		

文　　献

1) Angier, R. B., Boothe, J. H., Hutchings, B. L., Mowat, J. H., Semb, J., Stokstad, E.L.R., Subbarow, Y., and Waller, C. W.: *Science*, **102**, 227 (1945); **103**, 667 (1946).

2) 東　秀雄，村山繁雄，簗瀬正明，田部井菊子: 本誌，**24**, 776 (1959).

3) Teply, L. J., and Elvehjem, C. A.: *ibid*, **157**, 303 (1945).

ヤツメウナギ消化管の脂質及び Vitamin A

山田充阿弥
(東海区水産研究所)

Fat and Vitamin A in the Intestine of Lamprey, *Entosphenus japonicus* Martens.

Juami Yamada
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

In the adult lamprey, *Entosphenus japonicus* Martens, the potency of vitamin A is found at a very high level in various parts of the body. Among these parts, the alimentary canal, despite it weighing only one per cent of the body, contains the largest or nearly one half of the total vitamin A in the body as reported by Higashi *et al.*

Curious to know why such a large amount of vitamin A is concentrated in that organ, the author assessed the oil and vitamin A in the tissue as well as the contents of alimentary canal and obtained the following results:

1. Vitamin A in the alimentary canal oil was determined at the levels of 614,000 and 1,150,000 I. U. per gram on the sample materials I and II of the mature fish which were caught in a spawning stream of Yamagata Prefecture in February and May 1958, respectively. Perhaps the latter value is the highest of vitamin A ever known on any natural materials. The calculation showed vitamin A of 42,000 and 327,000 I. U. per gram of the tissue on the samples I and II. The vitamin A concentration in the alimentary canal contents was assessed at a level much lower than of the tissue (Table 1).

2. A greater part of the vitamin A was found in the ester form with the amount of free form larger in sample II than sample I (Table 3).

3. Nearly 75 per cent of unsaponifiable matter of the alimentary canal tissue consisted of vitamin A, indicating a unique character that has never been observed in vitamin oils from any other species of fish. On the other hand, the unsaponifiable matter in the alimentary canal contents revealed little vitamin A but much sterols (Table 2).

4. A postulation explaining high concentration of vitamin A in the alimentary canal of the lamprey is proposed as follows: When the lamprey return to the fresh water for spawning, they seem to consume more fat and protein than vitamin A which have been stored abundantly in various parts of the body during their sea life. In consequence a portion of vitamin A which becomes exceedingly high beyond a limit acceptable to the tissues of the other organs and muscle, will be transported from these parts to the alimentary canal tissue and then excreted from the tissue to the inside of the canal. In other words, most of vitamin A of the alimentary canal contents do not seem to be the remains of food but those excreted from the canal.

緒　　言

ヤツメウナギは体中に極めて濃厚に A を含むが，体各部の A の分布も一般魚類とは著しく異なつた特殊の魚である。中でも特異なことは消化管及びその内容物の A が極めて濃厚であり，消化管の重量は体重の僅か 1% にしか当らないが，その組織中に存在する A の総量はその魚体全体の A の約 30～50% を占め，

1958 年 12 月 12 日受理　　東海区水産研究所業績 B 第 305 号

消化管内容物のAをも合せれば更にそれを上まわる[1]。東等はこの多量のAはヤツメウナギの天然餌料の未吸収残留物ではなく恐らく消化管中に分泌されたものであろうとのべている。

ヤツメウナギがどうして体各部，殊に肉にAが著しく多いか，またそれがどのような生理的意義を有するかなどの問題に関しては殆んど明らかにされていない。著者はこの点の手掛りを得ることを期待して消化管及びその内容物のAの量や脂質の性状及びそれらの量的関係を調べた結果を報告する。

試料並びに実験方法

実験に供した消化管 Sample I は 1958 年 2 月中旬 32 尾の魚体から摘出し，Sample II は同年5月下旬 20 尾から摘出したものである。

試料魚はいずれも山形県最上川産で，漁獲後現地で数日間生絞(いけしめ)*され活魚のまま都内に輸送されたものである。採集した消化管は直ちに内容物を分離し，無水芒硝とエーテルで油分を抽出した。Aの測定は不鹸化物の Oser 補正法，エステル型及び遊離型Aの分離定量は藤田・青山法[2]，ステロールはヂギトニン沈澱法によつた。

実 験 結 果

（1） 消化管及びその内容物の A 含量

採集した消化管及びその内容物の A 含量を測定し Table 1 の結果を得た。即ち消化管脂質の A 濃度は Sample I は 61.4 万 I. U., Sample II は 115 万 I. U. で著しく高く，殊に後者のごときは従来知られている天然物中最高の値であろう。また組織 1g 当りのA含量は Sample I は 4.2 万 I. U., Sample II は 32.7 万 I. U. であつた。

内容物のA濃度は消化管組織中のそれよりは遙かに低いが，マグロ類，サメ類等の肝臓に比べれば相当に高い値である。

Sample I と II を比較すると後者は前者に比し消化管，内容物共に平均重量が少なく含油量が高く，A濃度は著しく高い。

Table 1. Vitamin A and oil in the alimentary canal and its contents of the lamprey.

Sample number	Number of fish from which the samples were collected	Canal tissue or contents	Avarage weight (g)	Oil content (%)	V·A in oil (I.U./g)	V·A in the sample (I.U./g)
I	32	Tissue	1.97	6.88	614,000	42,200
		Contents	1.29	4.20	62,000	2,600
II	20	Tissue	0.525	28.40	1,150,000	327,000
		Contents	0.250	11.72	305,000	35,800

Table 2. The content and composition of unsaponifiable matter of the sample oil.

Sample number	Alimentary canal tissue or contents	Content of unsaponifiable matter of oil %	Composition of unsaponifiable matter V·A %	Sterol %	Other substances %
I	Tissue	27.6	74.5	12.65	12.85
	Contents	10.8	12.0	56.70	31.30
II	Tissue	42.9	74.9	5.86	19.24
	Contents	20.4	46.2	17.02	36.78

（2） 不鹸化物及びステロール含量

消化管及びその内容物の不鹸化物，ステロール含量を Table 2 に示す。即ち消化管油の不鹸化物含量は Sample I は 27.6%，Sample II は 42.9%，不鹸化物のA濃度は Sample I は 246 万 I. U., Sample II は 247 万 I. U. でAは不鹸化物に対しそれぞれ

* 採捕後数日間生簀に入れ，輸送中の斃死を防ぐ。

74.5%, 74.9% を占めている。A とステロールの量を合計すると不鹸化物に対し Sample I は 87.2%, Sample II は 80.2% に達する。A とステロール以外の画分については今回は検索しなかつた。内容物中のステロール含量は不鹸化物に対し Sample I は 56.70%, Sample II が 17.02% で消化管のそれのほぼ 3～5 倍の量である。

（3） 遊離及びエステル型A

消化管及び内容物につき A を遊離型及びエステル型に分離して定量し Table 3 の結果を得た。即ち A の大部分はエステル型であるが，遊離型 A の含量は Sample II の消化管は Sample I のそれよりも遙かに高かつた。内容物には組織に比べ遊離型が多く且つ Sample II は I の 2 倍の値を示した。

Table 3. Ratio of vitamin A ester and free vitamin A in the alimentary canal and its contents.

	Sample	Free form %	Ester form %
I	Tissue	3.7	96.3
	Contents	12.4	87.6
II	Tissue	16.3	83.7
	Contents	26.3	73.5

Table 4. Difference in the vitamin A content of the alimentary canal and its contents by anatomical position.

Sample	Anatomical position*	Weight g	Oil content %	V·A in oil I.U./g	V·A in the sample I.U./g
Alimentary canal	Anterior part	0.16	...	...	26,900
	Posterior part	0.11	...	...	87,200
Contents	Anterior part	0.10	2.46	27,100	1,100
	Posterior part	0.11	4.26	292,000	12,400

* Although alimentary canal was divided into three portions, the middle part was not used for assessing vitamin A.

（4） 同一消化管の部位による A 含量の差異

ヤツメウナギの消化管は直線的な一本の管であるが，その部位による A 含量を検した。即ち消化管（全長約 21 cm）を三等分し，中央部を除き前部（胃に相当する部分であろう）と後部につき A 含量を比較した結果は Table 4 のごとくである。A 濃度は前部に比べ後部が約 3 倍も高く，また内容物においても後部は前部の 10 倍も濃厚であつた。

考　　察

以上のごとくヤツメウナギ消化管の油，特にその不鹸化物の性状は一般魚類の肝油とは著しく異なつている。即ちマグロ類，サメ類の肝油においては A が濃厚な場合でも A は不鹸化物に対し通常 30% 以下であり，ステロールは 10～50% を占めるが，ヤツメウナギの消化管の不鹸化物においては A が約 75% を占め，その他の成分は僅か 25% に過ぎない。本実験においてはグリセライドの量を測定しなかつたが，仮に本試料中のエステル型 A を炭素数 16 の脂肪酸エステルとして計算し，これに遊離型 A 及び他の不鹸化物を加えると全油に対し Sample I の消化管は 43% 以上，II は 66% 以上となる。従つてグリセライドの量は I は多くても 57% 以下，II は 34% 以下という計算になる。

このように消化管の油の性状が特異であり，殊に産卵期のものに著しいことの理由については本実験の範囲では明らかでないが，ヤツメウナギが遡上前に充分に A を貯蔵しており，河川を遡上し産卵するため肉質を消耗するが，この肉質消耗に際し A は他の脂肪，蛋白ほどには消費されずに体中に残り，この多量の過剰の A が消化管にも集積されてくるためではないかと考える。この点については続報に吟味する予定である。

摘　　要

1. ヤツメウナギ消化管とその内容物の油及び A の性状を検した。

2. 消化管の油のA濃度は著しく高く，2月に採取した試料 I では 61.4 万 I.U./g，5月に採取した試料 II では 115 万 I.U./g 万であつた。後者は従来知られた天然物中最高の値であろう。組織 g 当りについても I は 4.2 万，II は 32.7 万という極めて高い値を示した。内容物の油の A 濃度はそれらより遙かに低かつた。
3. 消化管の A の大部分エステル型で存在する。II は I よりも遊離型がやや多く，また内容物は消化管よりも遊離型が多い。
4. 消化管不鹸化物中，A は約 75% を占め，このように不鹸化物中の A 濃度が高い例は一般魚類の高単位肝油にも殆んど例をみない。内容物の不鹸化物は消化管のそれよりも A が少なく，ステロールが多い。

本実験に当り御指導を頂いた当研究所，東利用部長，平尾ビタミン科長に厚く謝意を表する。

文　　献

1) 東・平尾・山田・菊地：ビタミン，**13**，237，(1957).
2) 藤田・青山：ビタミン，**4**，176，(1957).

速　報

魚皮の螢光物質フルオロデルミンについて

平尾秀一・菊地　嶺
（東海区水産研究所）

Fluorodermin, a New Fluorescent Hydrocarbon in the Skin of Fishes.

Shuichi Hirao and Ryo Kikuchi

暗処で魚に紫外線をおこると多くの魚は紫がかつた螢光を発する。螢光は殆ど体の全表面に亘つて認められるが，鱗，胸びれ，尾びれ等は特に著しい。アジ等では体側のぜんごの部分が顕著であり，イトヨリ等では黄線の部分が tunaxanthin の螢光と相俟つて強い光輝を発する。螢光の肉眼的強さは照射紫外線の波長を 365 mμ にした場合と，253.6 mμ にした場合とでは前者の方が遙かに顕著である。

著者等はこの螢光は一種の炭化水素の存在に由ることを確かめ，魚皮からこれを結晶状に取出し，Fluorodermin と名ずけた。

抽出方法はサバの皮から脱水芒硝と ether で脂質を抽出し，鹸化し，不鹸化物を石油 ether からアルミナカラムに吸着せしめた。本物質はアルミナに殆ど吸着されずに石油 ether で展開されて下降し，吸着層は無色であるが紫外線を照射すると紫色の強い螢光を発する。この画分を集め，減圧濃縮後再びクロマトを行い精製した。本実験にはメルク製のアルミナをそのまま用いたが，更に活性度を高めたアルミナを使用しても吸着帯は分離しないから単一の物質と考える。減圧で溶剤を除き淡黄色の油状物を得た。収量は 30 尾分の皮から約 30 mg であつたが，ひれを原料とすれば更に収量が高いと思われる。油状物は石油 ether, $CHCl_3$ に易溶，EtOH に難溶（室温で EtOH 100 cc に 15 mg 以下）で，ether—EtOH 混液 (1:9) に温めて溶解し，減圧で ether の一部を蒸発して除き，徐冷して −10°C 以下に保つと白色樹枝状の結晶となる。m. p. 約 22°C. 本品の EtOH 溶液は紫外部 231.5 mμ, 260 mμ にそれぞれ 1 ケの吸収極大を有するから，本物質は分子内に共役二重結合を 1 ケ以上有するものと考えられる。近紫外部及び可視部には吸収極大を有しない。本物質の ether 溶液につき螢光スペクトルを測定し 413 mμ に単一の極大を有することを認めた。

サケの皮を同様に処理してサバのそれと同性状の物質を得た。この他，タイ，アナゴ，ヒラメ，キンギョ等の皮の螢光物質も，螢光の色，アルミナに対する行動等から，サバ，サケ等のそれと同物質と考えられ，結局 Fluorodermin は魚皮中に広く存在する物質であるといえよう。但しサケ，キワダ等に於ては本物質の他にも強い螢光性の物質が幾種類か存在することが，クロマトカラムの吸着帯から観察された。

サバ，マグロ等の肝油を本実験と同様に処理しても螢光物質の存在は認め難く，又スクアレンを含む深海サメ類の肝油も螢光物質の含量は少なく，螢光の色調も肉眼的に稍異るので Fluorodermin は魚皮に特有な物質といえるであろう。

Fluorodermin の発する螢光の波長域が 380 mμ から 500 mμ 辺に亘つていること，魚皮のカロチノイドがほぼこの範囲に吸収を有すること，水中に透入する自然光のスペクトルもやはりこの範囲にあること等から本物質もカロチノイド同様魚の光感応に関与する物質ではないかと想像される。恐らく魚が紫外線を感知し，或は紫外線を可視線に変えてカロチノイドの光吸収機能を助け，外界の僅かな光量の変化に感応する働きに関与しているのではなかろうか。

本実験に終始御指導頂いた東秀雄博士に厚く感謝の意を表する。なお本実験の詳細は東海区水産研究所報告第 22 号に発表する。

1958 年 11 月 10 日受理　東海区水産研究所業績 A 第 82 号

The Mechanism of the Slime Formation on Sugared Kamaboko—1.

Hitoshi UCHIYAMA and Keishi AMANO

(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

日本水産学会誌

第二十三巻 第十一号 別刷

昭和三十三年三月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of

the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 23, No. 11, March 1958

The Mechanism of the Slime Formation on Sugared Kamaboko—1.

Hitoshi UCHIYAMA and Keishi AMANO

(Tokai Regional Fisheries Reseaich Laboratory)

It is well known that the fish jelly product is one of the most important manufactured marine products in this country, not only because the product can be manufactured by a simple process but because of the fact that a food such as fish jelly product is very suitable to eat for the Japanese. There are many kinds of fish jelly products, and the one called "Kamaboko" is a popular favorite of the nation. The process of manufacturing Kamaboko is generally described by KIMATA[1] (1951).

Now, if the Kamaboko is placed at room temperature for a couple of days, it will produce a transparent, slimy material on its surface as if it were sweating; and this slimy material is called "Neto".

The experimental work of early days has indicated that this "Neto" may be made of bacterial colonies. KIMURA[2] (1935), for instance, stated that some sort of bacteria might be related to the formation of the "Neto", and that this type of spoilage was retarded to some extent by dipping the Kamaboko into a hydrogen peroxide solution (3%) for a short time immediately after it had been steamed. Although the use of hydrogen peroxide solution is tried quite often in manufacturing the Kamaboko, it has not entirely succeeded in realizing the expected result. The main purpose of the process is to bleach the surface of Kamaboko in order to improve the appearence of the product.

KIMATA (1951) examined the spoilage of the sugared Kamaboko, and submitted a report on the dominant bacteria which were related to the spoilage. His report shows that in most cases the cocci such as *Streptococcus*, *Leuconostoc* and *Micrococcus*, which produce acid out of sugar, making the causes of the spoilage. On the other hand, however, KIMATA[3] (1951) demonstrates in his another report an experiment on the bacteria in non-sugared Kamaboko, and indicates that the spoilage is affected mainly by *Micrococcus*, *Serratia*, *Flavobacterium* and *Achromobacter*, which are all very active in decomposition of the protein. In other word, the pattern of spoilage depends on whether or not the sugar is added to the ground meat. The chemical change during the process of spoilage was studied by SHIMIZU[4] (1935)who reported that the product containing sucrose increased in total acidity during spoilage and decreased in pH value without any change in ammonia quantity when the Kamaboko was incubated at 20°C for four days. According to KIMATA's experiment, however, the Kamaboko without sucrose produces a large amount of ammonia under the same condition.

In spite of the fact that there are a number of reports on the bacterial subjects, there

Received Sept. 30, 1957
Contribution B No. 274 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory.
Read before the meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries on Apr. 6, 1956.

has been almost none reporting on mechanism of slime formation.

In this report, are reported the results of studies of the chemical properties and of the precursor of slime when the sugared Kamaboko are spoiled.

Materials and Methods

Kamaboko.

The Kamaboko used in the experiments are manufactured from the white meat fish such as *Nibea argentata* (HOUTTUYN) and *Pseudosciaena manchurica* (JORDAN & THOMPSON) at a Kamaboko factory in Odawara. After these fish are beheaded, viscerated and split, the meat is minced by machine, and immersed in water for a short time to remove fat and coloring matter in the meat as well as nitrogen base which has been produced with decrease in freshness of fish. This bleaching process, called "Mizusarashi", is usually repeated three or four times. The refined meat is ground in a grinding machine with some salt and seasoning matters such as sodium glutamate and "Mirin", a kind of wine. Then, sucrose is added about 7 percent of this ground meat.

If the nature of fish meat is not sufficiently qualified to give the desired physical properties, elasticity and etc. to the product, the meat is ground with a small addition of potato starch. In this experiment, however, no starch is added to the ground meat. The meat paste is molded on a piece of wooden plate and is cooked for forty-five minutes at 80°C in a steaming box.

After the manufactured Kamaboko is taken off from the wooden plate and minced roughly by a chopper, it is transferred to one liter of sterilized flask stoppled with a cotton plug. Incubation is at 25°C.

Analytical procedure of sugar.

After a certain period of incubation, 10 grams of sample, in order to analyze the sucrose and reducing sugar, is extracted with 50 ml of hot water. After centrifugation the supernatant is decanted off into an evaporating dish. The extraction is repeated four times. After the extract is evaporated up to about 50 ml, it is deproteinized with 20 percent sodium tungstate solution and filtered. The reducing sugar is assayed directly in the filtrate with the reagent of BERTRAND. The sucrose is determined after it is hydrolyzed with dilute HCl solution for twenty-four hours at 25°C and is calculated from the invert sugar.

Isolation and purification of slime.

The slime formed on the Kamaboko is extracted with hot water and centrifuged. Methanol is added to the supernatant up to 20 percent concentration. To remove the bacterial cell and Kamaboko debris, the methanol-extract mixture is centrifuged again, and the concentration of methanol is finally adjusted to 50 percent in order to isolate the slime from the methanol-extract mixture by centrifuge. By repeating this procedure three times, the slime is purified as translucent, white mass and is dried up in a vacuum desiccator. The quantity of slime is assayed as glucose after it is hydrolyzed with 1 N sulfuric acid for seven hours in a oil bath at 120—130°C.

Lactic acid.

Lactic acid is determined by FRIDEMANN's method after both protein and reducing sugar

in the water extract of the sample are removed with trichloroacetic acid and copper sulfate, respectively.

pH *value.*

The pH value is determined by Tepe G Beckman pH meter.

Results

The results of experiments are given in Figure 1 and Tables 1 and 2. They are summarized as follows.

(1) Fate of sucrose during incubation.

As shown in Figure 1, the sucrose in the Kamaboko is decreased from approx. 7 percent to 2.5 percent in 2-day incubation at 23~25°C. At the same time, pH value is also decreased from 6.7 to 5.2 in accordance with sucrose degradation, and the transparent slime is produced on the surface of this ground Kamaboko. This slime is found to be of a certain acid nature to Litmus paper as KIMATA (1951) pointed out in his report.

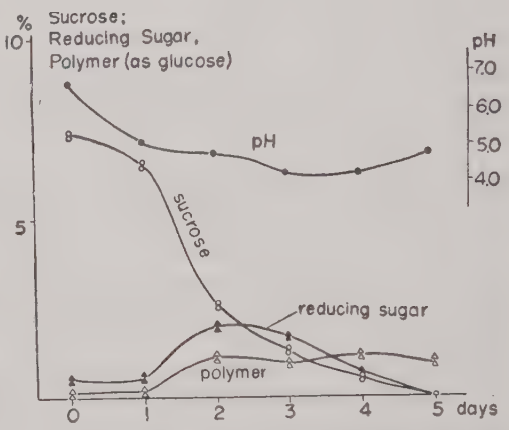


Fig. 1. Fate of sucrose in Kamaboko during incubation. Temp. 23—25°C

Reducing sugar, on the other hand, is increased in quantity with the sucrose degradation, but in 5-day incubation, both reducing sugar and sucrose are not detected in the same sample. However, it is noted that a certain carbohydrate polymer is produced in 2-day incubation. From the viewpoint of this fact, the spoilage pattern of this Kamaboko seems to be a certain polymeric decomposition as proved afterwards.

(2) Properties of the slime.

As mentioned above, the slime is purified by the alcoholic precipitation method. This dried material has the properties as shown in Table 1. It is soluble in hot water to form slimy solution, but is not soluble in aceton, pyridine, ethanol and chloral solution, and does not show the iodine reaction. The reagent of FEHLING is not reduced by this slimy solution itself, but is strongly reduced after HCl-hydrolysis. The SELIWANOFF's reaction and scatol reaction for fructose are proved to be negative.

From these results, the slime is considered as a dextran which is glucose polymer and given rise to from sucrose syrups and fermenting vegetable as well as from daily products when acted by chain-forming cocci which are classified as species of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc dextranicum.*

When *L. mesenteroides* is isolated from a sugared Kamaboko and allowed to act upon the sterilized sugared Kamaboko, for example, the sugar concentration of Kamaboko is rapidly reduced in 3-day incubation at 25°C to a level at which it is no longer detectable. And naturally, transparent slime is nevertheless produced on the surface. This

Table 1. Properties of slimy polymer isolated from spoiled sugared Kamaboko.
(in 2-day incubation)

Item of detection	Slimy polymer of Kamaboko	Native* dextran	Slimy polymer of *L. mesenteroides* **
Colour	white-grey	white-grey	white-grey
Cold water	swell	swell	swell
Hot water	sol.	sol.	sol.
Ethanol	Insol.	Insol.	Insol.
Aceton	Insol.	Insol.	Insol.
Pyridine	Insol.	Insol.	Insol.
Chloral (33%)	Insol.	Insol.	Insol.
Iodine reaction	−	−	−
Reduction of FEHLING's Son. (Polymer)	−	−	−
Reduction of Fehling's Soln. (hydrolyzate)	++	++	++
SELIWANOFF's reaction***	−	−	−
Scatol reaction***	−	−	−

* This dextran is used as the substitute blood plasma.
** The culture is carried out on sterilized sugared Kamaboko.
*** For fructose detection.

slime, as listed in Table 1, has quite similar properties to the slime produced when the marketable sugared Kamaboko is spoiled as mentioned above.

(3) Effects of various kinds of sugar on the transparent, acidic slime formation.

It has been well established that dextran is synthesized only from disaccharide or trisaccharide such as sucrose or raffinose. Therefore, if transparent, acidic slime is dextran itself, the kind of the sugar added to ground meat will hold the key to the slime formation. To confirm this matter, the various kinds of sugar, including polysaccharide, as listed in

Table 2. The transparent acidic slime formation under the effect of various kinds of sugar added in the ground meat. (at 22—25°C in 2-day incubation)

	Slime	pH	Lactic acid mg%	Remark
Glucose	−	5.84	41.8	−
Fructose	−	5.90	51.9	−
Maltose	++	5.45	104.0	transparent, acidic slime
Sucrose	++	5.49	110.1	transparent, acidic slime
Raffinose	++	5.55	85.8	transparent, acidic slime
Galactose	−	6.19	69.5	−
Arabinose	−	6.42	58.0	−
Inuline	−	6.67	61.4	−
Potato starch	−	6.16	66.2	−
α-Starch	−	6.39	69.5	−
Control*	−	7.18	39.8	−

* Ground meat paste only

Table 2, are added in place of sucrose to portion of the ground meat, and Kamabokos are usually manufactured from these meat pastes and incubated at 25°C.

As shown in Table 2, transparent and acidic slime is produced when Kamaboko contains disaccharide or trisaccharide, and lactic acid too is produced to a higher level than in the case of monosaccharide addition. The pH value is dependent upon the lactic acid formation.

Discussion

The present studies have affirmatively shown that the sucrose in a Kamaboko under incubation decreases rapidly, while reducing sugar rather increases to some extent, and also that a certain carbohydrate polymer is produced when the conversion of sucrose into reducing sugar is performed by bacterial contaminator in the sugared Kamaboko. Consequently, at the end of the incubation period, sucrose concentration becomes extremely low. The simplest and most successful explanation of this results seems to be that the reaction is a polymeric decomposition as shown in Figure 1. And a striking similarity is found between this carbohydrate polymer and pure dextran which is used as substitute blood plasma as listed in Table 1.

The synthesis of dextran is said to be facilitated by a bacterial enzyme which is called dextransucrase and classified as transglycosidase. This reaction can be represented as follows.

$$n\,C_{12}H_{22}O_{11} \rightarrow (C_6H_{10}O_5)_n + n\,C_6H_{12}O_6$$

Sucrose Dextran Fructose

FORSYTH[5] (1948) demonstrate that when media containing sucrose and other materials are incubated with strains of L. mesenteroides, copious yields of dextran result in and the reducing sugar then formed is proved by a paper chromatography to be fructose. Therefore, if polymeric decomposition is proceeding in the Kamaboko, it will be possible to see that the formed reducing sugar is mainly fructose which is converted from the sucrose. However, GIGLIO[6] (1953) reported, on the other hand, that the levels of the reducing sugar, the fructose, formed in such a way revealed a marked difference according to the strains of *Leuconostoc* genera. In some strain the fructose is maintained at a nearly constant value, while in another strain it is at a peak at the beginning of incubation and then declines rapidly towards a low level. Further, the conversion of fructose into mannitol becomes apparent when a considerable amount of fructose has accumulated in the medium. The sort of contamination bacteria in the Kamaboko are not of the same flora, and consequently the formed reducing sugar may be attacked by some bacteria other than *Leuconostoc* genera. However, the further experimental work is needed in this field in connection with bacteial flora and with possibility of mannitol production in sugared Kamaboko.

HEHRE[7] (1941), by using various kinds of sugar as the substrate, has made a comparative study of the dextran synthesis. He has proved that lactose, maltose, galactose, fructose, glucose, and a mixture of glucose and fructose can hardly be the substrate in the dextran synthesis, but sucrose can be the one. And in another report[8][9] (1943), he has shown that D-glucose-1-phosphate is not an intermediate in the formation of dextran from

sucrose, and that the dextransucrase requires no phosphoryrated sugar.

BARKER[10] (1951), in his review on the bacterial polysaccharide, described that only anhydro sugar unites can be utilized for the synthesis of new glycosidic bonds. In non-reducing disaccharide like sucrose, both sugar units satisfy this condition. Therefore, both moieties can furnish units for polysaccharide synthesis. In other word, sucrose can be converted to both dextran and levan.

In this connection, it has been noted that when disaccharide or trisaccharide is added a larger amount of slimy polymer is produced on the sugared Kamaboko than in the case of monosaccharide. This slime is also considered to have some relation to "Neto" of the sugared Kamaboko.

On the other hand, KIMATA (1951), as mentioned above, isolated *Leuconostoc mesenteroides* from a slime-spoilage Kamaboko. And the authors, too, isolated the same species as KIMATA did. When a transparent slime is produced sporadically on the surface of a sugared Kamaboko, several of the slimy colonies were picked up with a platinum loop. They were then put into sucrose media, and incubated aerobically in Petri dishes at 25 C. From all the colonies grown in such a way, Leuconostoc genera were always isolated and peculiar slimy colonies of *Leuconostoc* were produced on the surface of the media. As to bacterial matter, it will be described in the next paper.

The formation of the transparent slime from a Kamaboko containing raffinose seems to be undoubtedly effected through the hydrolytic convertion of this trisaccharide to sucrose and galactose. However, the slime of the maltose listed in Table 2 is not dextran.

Acknowledgements

The authors would like to express their cordial thanks to Mr. Tsuneo KOBAYASHI of the Tokyo University and to Mr. Hikaru SHINODA of the Nagoya Sugar Manufacturing Company for their encouragement and assistance. Upon submitting this report, the authors also feel more than grateful to Dr. Masao MIGITA who gave invaluable helps in correction of the manuscript, making a review on it.

Summary

When sugared Kamaboko is incubated for a couple of days at 25°C, the sucrose decreases rapidly, but the reducing sugar increases rather to some extent. At the end of incubation period, the sucrose and reducing sugar concentrations become extremely low. As reducing sugar increases, some slimy carbohydrate polymer are produced on the surface of Kamaboko. This reaction is considered as a polymeric decomposition. The slime shows an acid reaction to Litmus paper. The isolated slime, purified several times by alcoholic precipitation, does not reduce FEHLING's solution, but its hydrolyzate with HCl does so strongly. Furthermore, a striking similality is found between this polymer and pure dextran which is used as substitute blood plasma. From these facts, it is natural that the transparent, acid-nature slime is produced more abundantly by adding dissaccharide than by adding monosaccharide, certainly because of the fact that anhydro sugar units can only be utilized

for the synthesis of new glycosidic bonds. The dextran seems to be fairly related to the slime or "Neto" of the sugared Kamaboko.

References

1) M. Kimata: Memoire of the College of Agriculture, Kyoto University, 59, 68—81 (1951).
2) K. Kimura: "Suisan Seizo Zenshio" (Technology of Fisheries) (1935), Vol. 1, pp. 471.
3) M. Kimata: Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 16, 12 46—49 (1951).
4) W. Shimizu: Suisan Seizo Kaishi (Jour. Soc. Indust. Fish.), 3, 217 (1935).
5) W. G. C. Forsyth: Nature, 162, 150 (1948).
6) D. M. Giglio: Journal of Bacteriology, 65, 75—78 (1953).
7) E. J. Hehre: Science, 93, 2410 (1941).
8) E. J. Hehre: Pro. Soc. Fxptle. Biol. Med., 54, 204 (1943).
9) H. Taylor and H. Hibbert: Bacterial Polysaccharide, Advances in Carbohydrate Chemistry, 2, 203—233 (1946).
10) H. A. Barker: "Degradation and Synthesis of Complex Carbohydrate", in C. H. Werkman and P. W. Wilson (ed.), "Bacterial Physiology" (1951) pp. 513—544 (Academic Press, New York).

The Mechanism of the Slime Formation on Sugared Kamaboko. II. Identification of Dextran with Enzyme Preparation from Penicillium funiculosum

Hitoshi Uchiyama and Keishi Amano
(*Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*)

日本水産学会誌
第二十四巻 第十号 別刷
昭和三十四年二月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, No. 10, Feb. 1959

The Mechanism of the Slime Formation on Sugared Kamaboko. II. Identification of Dextran with Enzyme Preparation from Penicillium funiculosum

Hitoshi Uchiyama and Keishi Amano
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

In the first paper of this series (Uchiyama and Amano, 1958) a problem of slime formation, frequently encountered on the surface of sugared Kamaboko after certain period of storage, was described as to the factors being considered to promote this particular kind of spoilage.

The slime, or a substance referred to 'Neto' by the people of the industry, can be characterized with its watery transparency and jelly-like viscous property, that is produced only if sucrose or raffinose has been incorporated in Kamaboko products, and is never formed from some other sources of carbohydrate, including glucose, fructose, arabinose, galactose, starch and inulin.

When the spoilage of sugared Kamaboko takes place, a rapid decrease of sucrose is observed. However, after a certain lapse of storage time, the amount of reducing sugar shows a trend of increase, and, eventually the slimy carbohydrate polymer was produced on the surface of this food.

From these biochemical observations as well as chemical and physical properties of the purified product obtained from the slime by repeated precipitation with methanol, the writers presumed that dextran would be the most responsible instigator for the slime formation on a sugard Kamaboko.

In order to make further confirmation for the above conclusion, an identification test specific for dextran, using dextranase prepared from *Penicillium funiculosum*, was carried out in the present work.

In 1952, Jeanes et al already pointed out that *Penicillium funiculosum*, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium verruculosum* and other related molds are capable of developing an extracellular enzyme which splits dextran. In submerged culture of these micro-organisms, they found free enzyme which brings dextran into cleavage at the site of the α-1, 6 glucosidic linkage of this compound.

With regard to the enzymatic activity of dextranase, Kobayashi (1954) reported a case of *Penicillium* strain which produced an active dextranase when a certain

Received Oct. 6, 1958
Contribution B No. 303 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory.

amount of dextran was added to the culture medium prior to inoculation, meanwhile only a weak activity of the enzyme was noticed when the test strain was grown in dextran-free medium.

So, the microorganism and the cultural medium to be employed was carefully determined in this study from the angle of the above two articles.

Materials and Methods

'Neto' sample

The 'Neto' sample used in this experiment was prepared in a similar manner mentioned in the previous paper. First, 'Neto' was washed off with hot water from spoiled pieces of sugared Kamaboko which were introduced from a commercial plant in Odawara, the place well known for producing sugared Kamaboko. The suspension thus obtained was centrifuged in order to obtain 'Neto' preparations which were free from small fragments of Kamaboko. The supernatant was then added with methanol up to a concentration of 20 per cent to eliminate bacterial cells and minor amount of Kamaboko debris. After centrifugation, methanol was added to the supernatant so as to get final concentration of 50 per cent. The precipitate was then collected and dissolved in small amount of hot water, and further purification with methanol was repeated for three times. Approximately, 3 grams of dried 'Neto' product was obtained from 100 grams of comminuted sample of Kamaboko, which contains about 10 per cent of cane sugar.

Preparation of dextran splitting enzyme.

A 50 ml. portion of a modified Czapek's medium, containing 1% of dextran instead of sucrose, was placed in a 100 ml. Erlenmeyer flask and culture of *Penicillum funiculosum* from an agar slant was inoculated in this medium and incubated for 3 or 4 days at 30°C.

With development of the mold on surface of the medium, liquid portion, originally turbid due to the presence of dextran, became clearer which indicates production of dextranase in the medium. And the centrifugate obtained from the liquid portion was used as a crude dextranase solution.

Measurement of the change in specific viscosity of 'Neto' solution by addition of dextranase.

Dried 'Neto' was dissolved in hot water at a concentration which gave a specific viscosity between 0.8 and 1.0. After cooling, the solution was centrifuged in order to get an even consistency. Then, a 10 ml. quantity of the solution was placed into Ostwald's viscosimeter, fixed in a water bath at 25°C±0.1. After standing to equalize the temperature of test solution with that of water bath, 1 ml. of the dextranase solution was pippetted into the viscosimeter and the measurement was started immediatedly after mixing the solution and continued at intervals of five minutes.

Inhibition of dextranase activity by mercuric chloride.

Mercuric chloride was dissolved into filtrate from the culture of *Penicillium funiculosum*, so as to give the concentration of 10^{-2}M and the mixture was kept for 30 minutes at 30°C. A 1 ml. portion of the solution thus prepared was then added to 10 ml. of 'Neto' solution with specific viscosity of about 1.2. The specific viscosity was determined with respect to the lapse of time for two hours.

Calculation of intrinsic viscosity.

There has been established that the intrinsic viscosity of dextran depends largely upon its mean molecular weight, as pointed out by KOBAYASHI (1953). So, the value of intrinsic viscosity was computed from the figures of specific viscosity by the following formula,

$$[\eta]=\lim_{C\to 0}\left[\frac{\eta_{sp}}{C}\right]$$

where C is the concentration of test solution in terms of percentage of 'Neto'.

Identification of isomaltose, an end product derived from dextran by the action of dextranase.

By the action of dextranase from *Penicillium funiculosum*, a remarkable reduction in viscosity of dextran can be induced, followed by an increase of a small amount of reducing sugar in the system. KOBAYASHI (1954) found out that isomaltose and isomaltotriose were positively present as end product of dextran. So, the detection of these compounds would be competent to identify dextran.

In the present work, a paper chromatographic isolation of isomaltose was carried out by a developing solvent, a mixture of butanol, pyridine and water with the following proportions; 3:2:1.5

A 10 ml. portion of 'Neto' solution was added with 1 ml. of the dextranase solution and five drops of a mixture of chloroform and toluene serving preventive measure of spoilage during the progress of enzymatic action. After standing for 24 hours at 40°C, 10 ml. of ethanol was added to the whole solution to remove the unattacked 'Neto' compound as precipitate. Then the filtrate obtained from the above mixture was concentrated to dryness on a water bath. The dried residue was next dissolved in 0.5 ml. water and about 25 gamma of the solution was placed on the one end of a paper strip and developed by the butanol-pyridine-water mixture.

After the development was completed, a detection specific for isomaltose was made by spraying aniline hydrogen phthalate, a mixture of 930 mg of aniline and 1.6 g of phthalic acid dissolved in 100 ml. of butanol saturated with water. The strip of paper was then heated for 5 minutes at 105°C. to develop the dark brown colored spot of isomaltose.

Results and Discussion

In Table 1, the values of intrinsic viscosity for 'Neto' samples and dextran samples are shown for the benefit of comparison. A sample of pure dextran particularly prepared for clinical purpose, a product of Meito Co., Inc., gave a value of 0.75, almost doubled the values for the sample under study. There were a slight difference in the intrinsic viscosity between the 'Neto' from commercial Kamaboko and that from the culture, in which *Leuconostoc mesenteroides* was inoculated in a sterilized Kamaboko medium. However, the value for the dextran, obtained from a pure culture of *L. mesenteroides* in a medium containing pepton, yeast extract, sucrose, K_2HPO_4, and NaCl, was found to be rather higher than those of 'Neto' sample.

Table 1. Intrinsic viscosities of pure clinical dextran, 'Neto' and the dextran prepared by pure culture of *L. mesenteroides* isolated from spoiled sugared Kamaboko.

Variety of Sample	Intrinsic viscosity [η]
1. Clinical dextran	0.75
2. 'Neto'*	0.33
3. Pure cultured dextran**	0.40
4. 'Neto'***	0.39

* Prepared from commercial sugared Kamaboko.

** Cultivation of *L. mesenteroides*, isolated from a spoiled sugared Kamamoko, was carried out in a medium containing pepton K_2HPO_4, yeast extract, NaCl and sucrose.

*** Cultivation of the above strain of *L. mesenteroides* was carried out in a sterilized sugared Kamaboko.

The nutritional requirement of *Leuconostoc* strain in dextran synthesis is rather strict as pointed out by Whiteside-Carlson (1949). In fact, it is hard to produce dextran from sucrose, if thiamin, nicotinic acid and some other growth factors are lacking in the medium. Consequently, yeast extract is generally used to fill the requirement for dextran synthesis.

In Table 2, an example for no productivity of dextran was demonstrated in the medium in which yeast extract was entirely absent.

Table 2. Effect of omission of yeast extract on the acid and dextran production in sucrose medium performed by *L. mesenteroides*.

(A 3-day incubation at 25°C)

Mdium	PH	Sucrose g%	Reducing sugar g%	Dextran g%
With yeast extract (Before Inoculation)	7.51	10	—	—
With yeast extract	4.88	0.35	4.45	2.27
Without yeast extract	7.44	8.12	0.83	0

The basal medium employed has the same composition as given in the remark under Table 1.

Kobayashi (1952) mentioned that the intrinsic viscosity of dextran gives a linear relation with its mean molecular weight, for instance, each value for 0.39, 0.48, 0.84 and 0.80 corresponds to 53,200, 78,000, 152,000 146,000 of mean molecular weight,

respectively. Consequently, the value, 0.75, for the clinical dextran should be equivalent to a molecular weight between 130,000 and 140,000. And similarly, the intrinsic viscosity of 0.33 found for 'Neto' can be interpreted as a mean molecular weight of 40,000.

The fact that the value for the dextran produced by a strain of *Leuconostoc mesenteroides* from spoiled Kamaboko is low might be a problem, however, it could be attributed to a characteristic of each *strain of Leuconstoc*. McCLESKY (1947) grouped *Leuconostoc mesenteroides* into four different types by distinction of the colonies. And chemical and physical properties of these four types, A, B, D and F, were distinguishable with each other, as reported by JEANES (1956). Incidentally, the low level claimed for the intrinsic viscosity of 'Neto' from sugared Kamaboko seems to have some bearings with the type strain of *Leuconostoc* which dominantly develops on Kamaboko.

Dextran, once formed on sugared Kamaboko, is not likely decomposed by other kinds of microorganism which inhabit on the same stuff, because there is quite a similarity of the value of intrinsic viscosity between the 'Neto' from spoiled Kamaboko and dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* which has been isolated from the aforementioned sample, as shown in Table 1.

The breakdown of clinical dextran by dextranase from *Penicillium funiculosum* took place abruptly, immediately after addition of the enzyme to the sample. Figure 1 indicates the rapid decrease of specific viscosity happening in first ten minutes and a following slow diminution.

In case of Neto sample, the reduction in specific viscosity effected by that enzyme was observed as ranging from 1.0 to 0.4, in approximately 20 minutes standing, as seen in Figure 2. The difference in the extent of breakdown for both kinds of dextran, might be due to the possible prevalence in number of α-1, 6 glucosidic linkage of the clinical dextran over 'Neto' dextran.

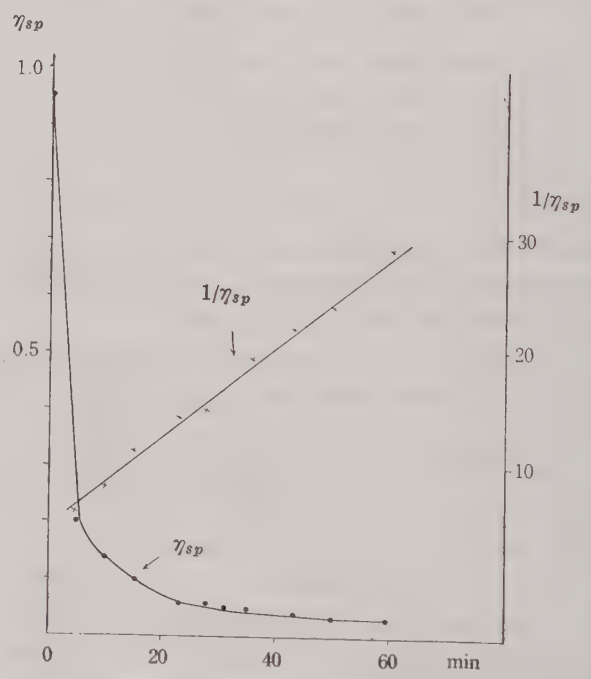


Fig. 1. Specific viscosity and reciprocal of specific viscosity of pure dextran under the action of dextranase from the culture of *Penicillium funiculosum*.

Because dextranase is capable of hydrolyzing only α-1, 6 linkage of dextran, so, the percentage of content of the linkage other than α-1, 6-linkage would be particularly

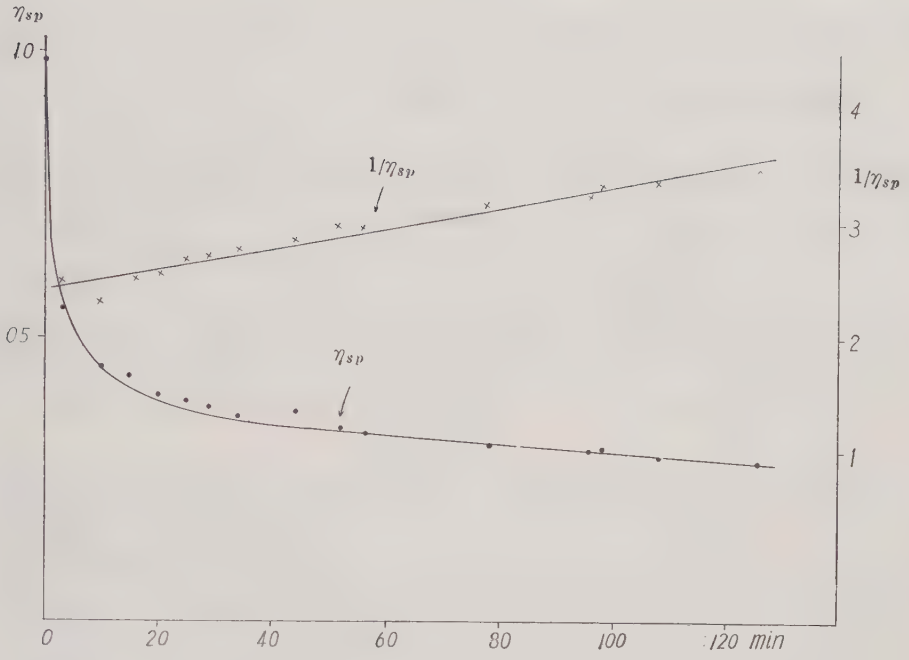


Fig. 2. Specific viscosity and reciprocal of specific viscosity of ' Neto ' under the action of the dextranase isolated from a culture of *Penicillium funiculosum*.

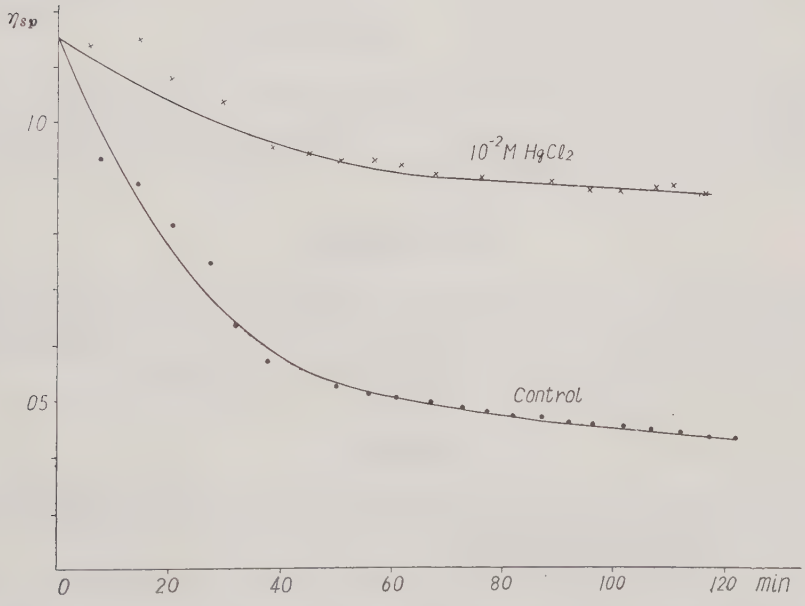


Fig. 3. Inhibitory effect of $HgCl_2$ against the dextranase from Penicillum funiculosum. The upper curve indicates the slowing-down of viscosity fall with application of a $HgCl_2$-added dextranase.

large in the case of 'Neto' dextran.

However, pattern of the change in reciprocal of specific viscosity was found linear to the time of reaction for both types of dextran.

This may mean that splitting by dextranase happens at a particular position in the structure of dextran. Probably, linear relationship between the reciprocal of specific viscosity and the time of incubation will not be observed, if all the linkages involved in such a highly polymerized compound were broken at random.

It is already known that the activity of dextranase is remarkably inhibited by a few kinds of heavy metal salt, such as $HgCl_2$, $CuSO_4$ and $AgNO_3$. In Figure 3, $HgCl_2$ indicates an inhibitory effect on the dextranase solution prepared from *Penicillium funiculosum* at its concentration of 10^{-2} M, after incubation for 30 minutes at 30°C in the enzyme solution.

By paper chromatographic isolation, presence of isomaltose was confirmed in the 'Neto' solution treated with dextranase. As shown in Table 3, Rf value of 0.3 obtained for the sample agreed well with that of pure isomaltose. There was found also another spot with Rf value 0.18, which is assumed as isomaltotriose because of its good conformity in Rf value, though a standard run with pure isomaltotriose was not carried out. From the finding above discussed, it will be certain that the slimy product, so-called 'Neto', from sugared Kamaboko chiefly consists of a kind of dextran with a comparatively small number of α-1, 6 linkage.

Table 3. Paper chromatographic identification of the end product of 'Neto' and pure dextran by means of a dextranase from *Penicillium funiculosum*.

Sample used	Rf	Rf
Isomaltose	0.30	—
Dextran*	0.30	0.18
Dextran*	0.29	0.18
'Neto'	0.29	0.18

* Clinical dextran.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Tsuneo KOBAYASHI of the Tokyo University for his encouragement and assistance. Also, the authors thank Prof. Yasuhiko TSUCHIYA of Tohoku University for his effort in supplying us with isomaltose.

Summary

It became more certain that the 'Neto' product from sugared Kamaboko may be dextran by the following observations.

1. Viscosity of the 'Neto' solution as well as that of a clinical dextran solution decreased when subjected to hydrolysis by dextranase which was prepared from a culture of *Penicillium funiculosum*. And the rate of reduction in viscosity was greater for pure clinical dextran than for 'Neto' dextran. Therefore, the number of α-1, 6 linkage

in the structure of 'Neto' dextran would be smaller than that in the pure clinical dextran.

2. The activity of the dextranase from culture of *Penicillium funiculosum* was weakened by addition of mercuric chloride.

3. The intrinsic viscosity of 'Neto' dextran was smaller than that of pure clinical dextran. The difference would be due to the type of *Leuconostoc* strain which grows on Kamaboko product.

4. The presence of isomaltose in the hydrolysate resulted by dextranase action was ascertained by paper chromatographic identification. And, probably, isomaltotriose could be formed as well under the same circumstance.

References

1) H. Uchiyama and K. Amano: Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, **23** 716–722 (1958).
2) A. Jeanes: Journal of Bacteriology, **64**, 513–519, (1952).
3) T. Kobayashi: Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, **23**, 351–357 (1957).
4) T. Kobayashi: Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, **25**, 421–423 (1953).
5) V. Whiteside-Carlson: Journal of Bacteriology, **58**, 134–141, (1949).
6) C. S. McClesky: Journal of Bacteriology **54**, 697–708, (1947).

魚肉ソーセージの軟化現象について—Ⅰ.

軟化部分の特徴とその顕微鏡観察

内山　均・田中武夫
（東海区水産研究所）

日本水産学会誌
第二十四巻　第二号　別刷
昭和三十三年六月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, No. 2, June 1958

魚肉ソーセージの軟化現象について—I.

軟化部分の特徴とその顕微鏡観察

内山 均・田中武夫
(東海区水産研究所)

The Softening Deterioration of Fish Sausage—I. Some Chemical and Microscopical Aspects

Hitoshi Uchiyama and Takeo Tanaka
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

Recently, fish sausage has risen to be one of the important marine products in our country. This article is manufactured essentially from the meat of fish such as black marlin or from the mixture of this and yellowfin tuna. In addition to the fish meat, small amount of potato starch and the fat of porks are added as sub-materials. After being minced the fish meat is ground into a paste along with these sub-materials and various spices. The meat paste, after being colored with a synthetic red pigment, is packed into a casing of chlorinated rubber or vinyliden chloride by an air stuffer and then sealed up with cotton or hemp thread. Finally it is cooked in a hot water bath at 80～90°C. for about 50 minutes.

Fish sausage manufactured in such a way belongs to the articles referred to as semi-preservative food. Although the product is generally expected of its preservability covering a month or so, sometimes are found degraded articles showing various types of spoilage among the commercial fish sausages especially in a summer season (see Table 1).

The softening is a peculiar type of spoilage of fish sausage and given rise to sporadically in the inside of the product as seen in Fig. 1. This spoilage is different in some respects from the common spoilage familiar among fish meat or other fish jelly products.

The results of experiment will be summarized as follows;

1) The softening spoilage is not observed in freshly prepared fish sausage. Presumably, the spoilage has no relation to the deteriorated meat like the jelly meat and the honey comb which are occasionally met with in canned products.

2) The quantity of ether soluble fatty acid, as shown in Table 2, increases in the softened portion more markedly than in the non-softened portion; and the pH value seems to affect the quantity of such fatty acid. But no difference in volatile basic nitrogen is found between the softened portion and the non-softened.

3) When *Cl. sporogenes* or *Cl. welchii* is allowed to act on the sterilized fish sausage meat paste, the softening is also produced always in accordance with gas formation, sometimes being attended by a vile smelling. The softening deterioration mentioned above, however, never produces either gas or vile smelling at all. Furthermore, no relation is found to hold between the softening deterioration and the presence of spore-forming anaerobes as seen in Table 1.

4) From the results of microscopic observation on the softened portion, it may be pointed out that starch granules in the softened portion has been substantially disintegrated as seen in Figs. 4 and 5, while those in the un-softened portions are not so (Figs. 2 and 3). From these facts, the softening of the sausage seems to be effected through the disintegration of the starch granules.

1958 年 1 月 21 日受理
東海区水産研究所業績 B-279

5) There are considerable resenblances between the softening deterioration of fish sausage and the flat sour spoilage of canned foods in some points of view.

魚肉ソーセージの生産が，急に増大したという原因の一つには，このものが，これまでの水産煉製品に比較して貯蔵性があるということであろう。たしかに，魚肉ソーセージの貯蔵性は，特筆すべきものに思われるが，実際市販の製品をみると，未だ改良しなくてはならない問題を多く含んでいるように思われる。その一つに軟化現象がある。

製造された魚肉ソーセージを，30°C 前後の温度に放置しておくと，内部が部分的に軟化して来ることがある。或る場合には，全面的に軟化現象が認められることもある。特別の臭気もなく，膨脹もなく，したがって，一見変敗しているかどうか，わかりにくいにも拘わらず，後述するように，市販製品の変敗のうちで軟化が占める割合は，決して少いとはいえない。

著者等は，斯く軟化した製品の特徴，その一般分析，及び軟化部分の顕微鏡的状態などについて，二三の検討を行つたので，その結果を報告したいと思う。

実 験 方 法

1. 試　　料

魚肉ソーセージは，東京の工場から市販されているものを選んだ。其の製法は次のようである。黒皮カジキを主原料とし，約 10% の馬鈴薯澱粉，及び食塩，香辛料，豚脂を加え，全く市販品と同じ配合組成の摺身を塩酸ゴムに肉詰して，85°C, 45 分間の加熱を行う。加熱の終了後，製品は直ちに逆性石鹸の 1000 倍溶液に投入して冷却させる。その目的は，ソーセージの結び目から，二次的に細菌*が侵入し汚染することを防ぐためである。この様な試料を 30°C に貯蔵し，軟化の発生が著しくなつた時に，軟化部分と非軟化部分とに分けて分析に供した。なお，30°C に貯蔵中も，結び目の両端を逆性石鹸の溶液に浸して，二次汚染の危険を防いでおいた。

2. 揮発性塩基窒素

試料 5g に 5% の三塩化酢酸 20cc を加えてすりつぶし沪過する。沪液を試料として，CONWAY unit を用い常法にしたがつて測定した。非蛋白態窒素は，上述の三塩化酢酸の沪液を用い micro KJELDAHL 法により測定した。

3. Ether 可溶性揮発性酸及び不揮発性酸の測定

試料 10g に脱水芒硝を倍量加えて，よくすりつぶし 50cc の ether を加えて 30 分間振盪器にかけた。ether 区分を分別してから，試料残渣に 50cc の ether を再び加えて振盪する。この操作を3回くりかえし，最後に ether 抽出区分を分液沪斗に集め，蒸溜水を加えて振盪し脂肪酸を水に移行せしめた。この操作を3回くりかえし，最後に ether 層より分別した水区分を 100cc に定量とした。この一定量を phenol rot を指示薬として，0.01N NaOH で滴定し，この値から総酸量を算定した。別に一定量を蒸発皿にとり湯煎上で蒸発乾固してから，これに蒸溜水を加えて，上述の方法によつて滴定し，この値を不揮発性の酸量とした。総酸量から不揮発性の酸量を差引いて，揮発酸量とした。不揮発酸は乳酸として，揮発酸は醋酸として計算した。

4. 嫌気性芽胞形成細菌の検出

偏性嫌気性芽胞形成細菌の検出には，resazurin 添加，thioglycol 酸乾燥培地 (T. G. C. 培地) を用いた。すなわち，本培地 30g を 1*l* の蒸溜水に溶解し，2% にたるように寒天を加える。そして pH を修正し 15lbs. 15 分間殺菌した。本培地を高層とし，*Cl. sporogenes*, あるいは *Cl. welchii* の如き偏性嫌気

---

* 結び目から二次的に細菌の侵入をうけて魚肉ソーセージが膨脹することを著者らは既に指摘した。缶詰の巻締不良，あるいは leaker spoilage と同じような原因によるものといえよう。(魚肉ソーセージ講習会要録，Vol. I (1956); Vol. III (1957)).

性細菌を接種すると，resazurin の下部に亀裂を生じるので，このような嫌気性芽胞形成菌の有無を検討するのに便利である。なお，魚肉ソーセージ中の嫌気性芽胞形成菌は，一定量の試料を，生理的食塩水中に加え，80°C, 45 分間の加熱後，この浮遊液 1cc を上述の培地に加え，よく混合してから冷却し，37°C, 1 日間培養して検討した。また，嫌気性芽胞形成菌が，魚肉ソーセージの腐敗にどのような特徴を与えるかを観察するために，間歇殺菌したソーセージの摺身に *Cl. sporogenes*, *Cl. welchii* を接種し，内部の空気を水素で置換させた jar の中で，嫌気的に培養して検討した。

5. 顕微鏡標本の作製及び写真撮影

先ず予備試験的に，軟化部分を固定せずに直接 gelatin で包埋し，凍結ミクロトームで切片を作り，位相差顕微鏡で観察した結果では，混合澱粉粒子に多少の変形が認められた。そこで，更によく澱粉粒子を観察するために，つぎの方法をとつた。すなわち，軟化部分を中心に $(0.5\text{cm})^3$ 大の試料をとり CARNOY の液で固定 (20°C, 約 2 時間) 後，軽く無水 alcohol で洗い，gelatin で包埋し，そのものを凍結ミクロトームで切断し，得られた切片 (厚さ 7～10μ) を LANGHANS の沃度反応法[1]の変法で染色した後封入して検鏡した。ここでいう変法とは，切片を LUGOL 液に 4～5 分間つけた後，純 alcohol 4: 10% iodine tincture 1 の混合液に (脱水が目的ではなくて色あげをよくするために) 瞬時つけてから水洗し，glycerol で封入するという簡単な方法である。なお，本法で染色してから，いわゆる alcohol 及び xylol 系列の脱水—透徹処理を行つたり，あるいは染色後，封入剤として APÁTHY の gum syrup，または oliganum 油を用いる常法を採つてみたが，いずれも沃度で褐色に染まつた澱粉粒子が短時間のうちに脱色してしまい具合が悪かつた。また BEST の carmin (Grübler 会社製) による染色も澱粉粒子の染別が悪く不適当であつた。しかし上記の簡便法によれば，澱粉粒子の染分けは明瞭に行き，更に，その色は室温で 3～4 日程度，0°C の冷暗室では 2 カ月以上も脱色することなく，極めて好都合であつた。

非軟化部分からも，全く同様な方法で標本を作り，軟化部分と比較してみた。なお，澱粉以外の二成分，即ち“肉のり”(蛋白) と豚脂からなる部分についてもその状態，分布及び変質状態 (染色性) などを概観するために，軟化及び非軟化部分の凍結切片を eosin 染色あるいは sudan-III 染色して比較した。

Fig. 1. The inside view of a fish sausage sample subjected to the softening deterioration during maintained for a month at 30～34°C.

標本の顕微鏡撮影では特筆すべきことはないが，フイルムは Agfacolor negative を用いた。したがつて，沃度澱粉反応や eosin 染色，或いは -sudan-III 染色などが鮮明に色分けして観察できたが，経費の都合で，ここでは単色写真のみを掲載する。しかし，それを補足する意味での模式図を加えて説明したい。

実 験 結 果

1. 軟化現象の特徴

Fig. 1 は軟化魚肉ソーセージを縦に両断して，軟化部分を示したものである。当試料は 30°C に約 30 日間貯蔵したものであるが，軟化が部分的に発生していることがよくわかる，典型的な軟化試料といつてもよい。特別の臭気もなく，ガス膨張もない。更に，軟化部分は非軟化部分と比較して変色もしていない。この程度の軟化であると切り開かない限り外観だけでは検出不可能である。ただ軟化現象は，必ずしも部分的に発生するとは限らず，少数例ではあるが，全体に亘つて一様に軟化していることもある。

ところで，製造直後の魚肉ソーセージには，軟化しているものはない。実際，市販のソーセージを業者別に，37 例ほど検査してみたが，その範囲では一例も軟化製品は見当らなかつた。したがつて，軟化は，原料魚肉の Jelly meat とか honey comb のような変質肉に起因しているとは思われない。しかし，これを 30°C 前後に貯蔵しておくと，早いもので 5 日程度で直径 2 mm ほどの軟化部分が形成される。これが次第に増大して日時の経過とともに Fig. 1 に示すような様相を呈するようになる。軟化部分は非常に軟く，マッチ棒の如きもので，容易にえぐりとることができる。

2. 変敗魚肉ソーセージ中に占める軟化製品の割合と偏性嫌気性芽胞形成菌との関係

軟化製品は，その検出が外観からは容易でないとしても，実際の変敗製品中に占める割合は，決して少なくないようである。

1957 年 7 月から 9 月にかけて，各地から変敗ソーセージを送つてもらい，これを軟化の有無，揮発性塩基窒素量及び嫌気性芽胞形成菌の有無などの項目に分けて検査してみた結果，Table 1 に示すような値が得られた。

Table 1. Spoilage types of commercial fish sausage.

No.	District of production	Organoleptic observation	vile smelling	pH	Volatile basic nitrogen *mg.*	Spore forming anaerobs detected
1	Tokyo	Softening	−	5.05	19.2	−
2	Shikoku	Souring	−	6.19	25.0	−
3	Tokyo	Softening	−	5.50	45.2	−
4	Aichi	Souring	−	5.21	35.1	−
5	Aichi	Souring	−	6.09	35.4	−
6	Shizuoka	Crumbling	＋	5.40	90.1	＋
7	Shizuoka	Souring	−	6.02	33.9	−
8	Shizuoka	Crumbling	＋	5.55	85.7	＋
9	Hokkaido	Discolouration	−	6.42	14.1	−
10	Tokyo	Souring	−	5.50	50.8	−
11	Tokyo	Softening	−	5.25	27.2	−
12	Kagoshima	Souring	−	5.27	83.6	−
13	Kagoshima	Souring	−	6.10	19.6	−
14	Hokkaido	Discolouration	−	5.22	24.0	−
15	Hokkaido	Souring	−	5.09	32.0	−
16	Tokyo	Softening	−	5.30	87.2	−
17	Kanagawa	Softening	−	5.77	44.8	−
18	Kanagawa	Softening	−	5.65	37.6	−
19	*Cl. sporogenes**	／	＋	6.70	88.4	＋
20	*Cl. welchii**	／	＋	6.14	20.4	＋

* Cultivation of the bacteria was carried out in sterilized fish sausage meat paste anaerobically in a jar filled with hydrogen gas.

直送された変敗製品は 18 社のものであるが，このうち軟化を伴う変敗は 6 例見られる。そして，嫌気性芽胞形成菌の検出されぬものでも，酸敗による変質が非常に多い。後述するように，軟化も酸の形成と共に発生することから考えれば，酸敗製品が変敗魚肉ソーセージ中に占める割合は，極めて多いといえよう。

井野氏[2]は，魚肉ソーセージの変敗と偏性嫌気性芽胞形成菌との関係を重要視し，*Cl. sporogenes*, *Cl. welchii*, *Cl. butyricum* 等の細菌によつて，ソーセージが汚染された場合は，ガス膨脹をおこし肉質がボ

ロボロとなり崩壊すると報告している。著者等の場合にも Table 1 に示したように，嫌気性芽胞形成菌が検出されたものでは，井野氏の指摘した現象が見られた。(No. 6, 8)

しかし Table 1 に見られるように，軟化の発生と嫌気性芽胞形成菌との間には一致した関係がない。したがつて，ここでいう軟化は，嫌気性芽胞形成菌に起因するものとは，本質的にその性質を異にするものと思う。

3. 軟化部分の一般分析

Table 1 で見られるように，軟化製品は酸敗製品と同様に pH が低い。製造直後の魚肉ソーセージの pH は大部分が 6.20～6.30 の範囲にあるが，軟化部分の pH は 5.02～5.77 の範囲にある。そして同一試料の軟化部分と非軟化部分では，前者の pH が低くなるという傾向がある。これと同時に，軟化及び非軟化部分の ether 可溶性の脂肪酸量には，かなりの相違が見られる。すなわち，軟化部分の揮発性酸は，Table 2 に示す様に醋酸として 115.5mg % であるが，非軟化部分のそれは 57mg % である。また，乳酸として換算した不揮発性酸量も，軟化部分では非軟化部分に比較して，かなり増大していることがわかる。しかし，揮発性塩基窒素，非蛋白態窒素の形成量には，殆んど両者の間に相違が見られない。

Table 2. Analysis of fish sausage having undergone softening deterioration.

Portion analysed	pH	Volatile basic nitrogen (*mg. %*)	Non protein nitrogen (*mg. %*)	Ether soluble fatty acid	
				volatile* (*mg. %*)	non volatile** (*mg. %*)
Softened	5.48	9.7	399	115.5	603
Un-softened	5.66	13.7	413	57.0	504

* As acetic acid
** As lactic acid

4. 軟化及び非軟化部分の顕微鏡観察

燻製品の内部に存在している澱粉は，粒子のまま糊化し埋没していることが知られているが，魚肉ソーセージ内の澱粉も Fig. 2 (非軟化部分を約 60 倍に拡大した写真) にみるように micrometer で測ると 20×20～40μ 程度の粒子として“肉のり”の中に分散し，埋没していることがわかる。その粒子の数は甚だ多く，視野内 4 分の 1 近くを澱粉粒子がしめている。そして，沃度反応により染色されている部分が楕円形をした澱粉粒子内部の殆んど全部を占めていることが認められる。このことは Fig. 2 を拡大 (倍率，約 300) した Fig. 3 及び模式的に画いた Fig. 6 (I) において更によく了解されるであろう。

これに対して軟化部分では，Fig. 4 に示す様に，視野内の澱粉粒子の数は非軟化部分と変らないが，沃度で染まる部分が粒子内中央部の 10×10～20μ 程の部分に限られ，粒全体からみた時には，それは恰も細胞の原形質分離のような形を示している(この点は Fig. 5 において更に明瞭である)。このことは，澱粉粒子がその周辺から徐々に侵され，粒中央部を除いては，沃度反応陰性の低分子物質にまで分解されてしまつたことを意味するものであろう。このような粒子の侵され方は，Fig. 4 及び 6(II) に示すように，軟化の中心程著しい，そして中心から遠ざかつて周辺の非軟化部分に近づく程少なくなる，そして遂には粒子全体が殆んど沃度で染まるような全く侵されていない非軟化部分になる。

つぎに eosin 並びに sudan-III の染色結果では，軟化部分の“肉のり”部分及び脂肪部分の形態，分布，そして染色性などの点において，非軟化部分と殆んど変らず，両者の間に差異を認めることは出来なかつた。添加した豚脂が，予想以上に 20×30～50μ 程度の小ブロックで分散し肉質間に埋没していることは興味深い (Fig. 6 参照)。

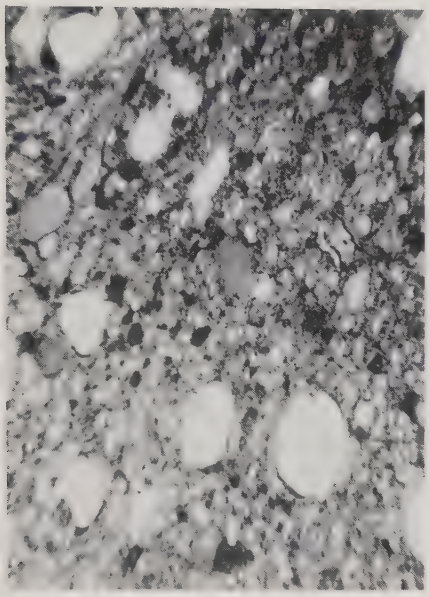


Fig. 2. Potato starch granules in the un-softened portion.
Magnification × ca. 60.

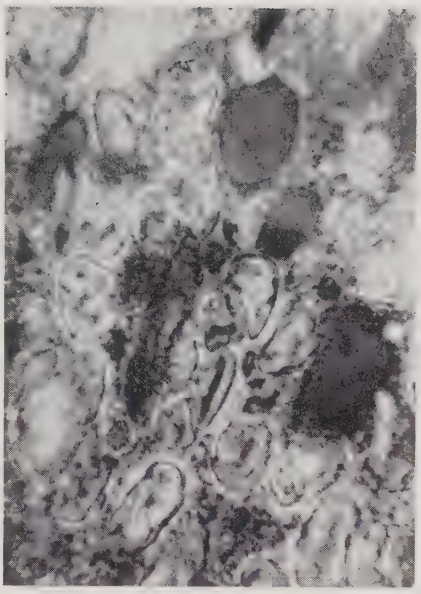


Fig. 3. Potato starch granules in the un-softened portion.
Magnification × ca. 300.

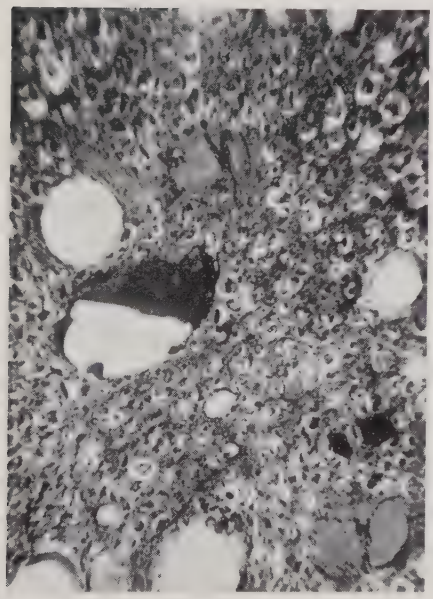


Fig. 4. Potato starch granules in the portion of softened deterioration.
Magnification × ca. 60.

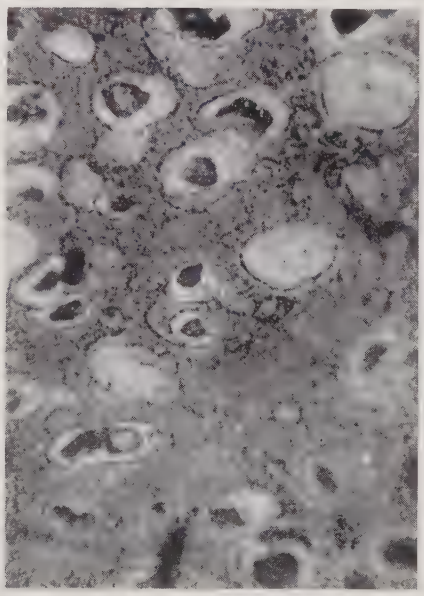


Fig. 5. Potato starch granules in the portion of softened deterioration.
Magnification × ca. 300.

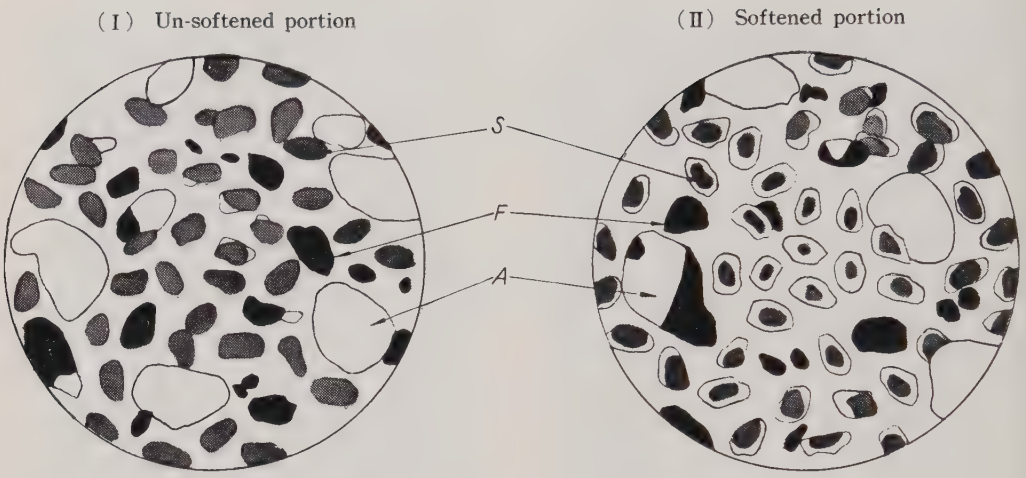


Fig. 6. Schematic drawings of un-softened (I) and softened portion (II).
S····Starch granule, F····Pork-fat particle, A····Air bladder

考　　察

軟化現象は変敗製品中でかなりの割合を示しているようだが，その発生は6～9月の高温の時期に多いようである。またこの現象は，数年前から一部の人の注目を引いてはいたが，ガス膨脹する製品のようにその変化が顕著でないので，比較的知られていない変敗の一つである。

軟化の特徴として，酸の形成が著しいこと，そして揮発性塩基量に，軟化及び非軟化部分とも著しい相違が認められないことは，軟化の原因が，魚肉ソーセージの蛋白部分の分解ではなくして，弾力の補強剤としての澱粉部分が崩解された結果おこるという推定が成立つように思う。かかる推定は，軟化部分の肉蛋白の部分及び脂肪の部分にさしたる変化が見られず，主として澱粉粒子の部分において，粒子内周辺が消化されたような様相を示した顕微鏡観察の結果からも，充分裏付けられるようである。岡田氏[3]によれば，種々の煉製品に含まれる澱粉が弾力補強剤としての効果を現わすには，澱粉粒子がそのままの形で糊化し埋没していることが必要であるという。したがつて，Fig. 4 及び 5 に見られるように，澱粉粒子が崩解し“肉のり”との間にすき間が生じたかのような状態になれば，その弾力補強効果は低下し，軟化してくることは当然考えられることである。而して，試料の固定，包埋，染色の操作を経ないで，かなり困難ではあつたが，直接凍結ミクロトームで切断した二，三の切片を位相差検鏡してみた結果では，軟化及び非軟化部分の澱粉粒子の状態は，Fig. 2～5 に示したものと同様であつた。それ故，Fig. 2～5 にみられた澱粉粒子の状態は，標本作製中に二次的に生じた，いわゆる artefact の結果ではなくて，魚肉ソーセージ中に既に形成されたそのままの状態とみてよいであろう。

軟化の原因に，澱粉粒子の影響を重要視しなければならない他の理由は，細菌学的にもありうると思う。

殺菌した魚肉ソーセージの擂身に proteolytic の *Cl. sporogenes* を接種して，嫌気的に培養した場合，やはり一種の軟化がおこる。そして同時に著しい揮発性塩基窒素の形成を伴う (Table 1, No. 19)。これに反して saccharolytic の *Cl. welchii* を接種した場合は，軟化はおこるが，揮発性塩基窒素の増大を伴わない (Table 1, No. 20)。もし軟化現象が蛋白の分解に起因していたならば，揮発性塩基の増大或は可溶性窒素の増大を伴うように思われるが，軟化製品には，揮発性塩基のかかる増大は実際には見られないのである。この外，魚肉ソーセージの様に，微量ではあるが醗酵性の糖を含んだ（時によつては副原料として sucrose を加えることもある）食品にあつては，いわゆる Protein sparing effect[4] の関係から蛋白部分が分解されにくいということも考えられる。いずれとしても，この問題を改めて追求する必要を認めたので，蛋

肉部分の分解の程度及び軟化原因細菌が，嫌気的条件下でどのような性質を示すか目下検討中である。

Table 1 の No. 12 及び 16 の試料は，嫌気性芽胞形成菌の検出も無く，腐敗臭も無いにもかかわらず，揮発性塩基量の増大が見られる。原料魚に鮫を用いたか，他の何らかの理由によつてこれが増大したか，いまのところ不明である。

魚肉ソーセージの加熱は 80°～90°C で約 40～50 分の処理が行われるのであるから，当然残存細菌については，芽胞形成細菌との関係を重要視しなければならない。更に前述のように，軟化の特徴をみてくると軟化現象は缶詰の flat sour spoilage[5] と非常によく似た点がある。したがつて，その原因細菌については facultative *Bacillus* との関係が重要であろう。これについては次報で報告したい。

要　　約

1) 魚肉ソーセージを製造後 30°C 程度の温度に放置しておくと，早くて 5 日前後，おそくも 1 カ月くらいで，部分的に軟化がおこる (Fig. 1 参照)。この軟化現象について検討した。

2) 軟化は，夏期高温の時期に発生し易い。その部分は，特別の臭気も無く膨脹もない，また色調も非軟化部分に比較して変つていない。したがつて，外観からは一見その検出が不可能である。しかし，市販魚肉ソーセージの変敗品中に占める軟化製品の割合は決して少なくない (Table 1 参照)。

3) 軟化部分は，非軟化部分に比べ，一般に pH が低く，ether 可溶性の脂肪酸の含量が大である。だが揮発性塩基窒素の増大を伴わない (Table 1, 2)。その変敗の様相は，缶詰の flat sour spoilage に似ている。

4) 嫌気性芽胞形成菌である *Cl. sporogenes* あるいは，*Cl. welchii* を魚肉ソーセージに接種した場合も一種の軟化を形成するが，ここでいう軟化とは本質的にその性質を異にする。

5) 軟化及び非軟化部分を顕微鏡観察した結果，軟化部分の澱粉粒子は，粒子内周辺が沃度反応を呈さず，僅かに粒子内中央部のみが之を示し，粒子全体からみた時に，それは恰も細胞の原形質分離のような形を示している (Fig. 4, 5, 6 (II))。これに対して，非軟化部分は，魚肉中に埋没した澱粉粒子が，糊化したまま全面的に沃度反応を示す (Fig. 2, 3, 6 (I))。燐製品に加えられた澱粉の弾力補強剤としての効果は，澱粉粒子がそのままの形で存在しているときに現われるということから考えれば，軟化部分の澱粉粒子のように周辺が消化されている場合には，その効果は低下し軟化が生じてくるものと思われる。

終りに，顕微鏡撮影にいろいろ御指示を得た本研究所　竹村嘉夫氏に，また，変敗ソーセージの入手に際し便宜を与えられた魚肉ソーセージ協会　溝江進氏に厚く御礼申上げる。

文　　献

1) 稽方知三郎：“病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき”，改訂 8 版，南山堂，東京，(1954)，pp. 187～189.
2) 井野米次：腐敗研究所報告，**7**，31～42 (1957).
3) 岡田　稔：水産学会誌．投稿中．
4) 木俣正夫：“食品保蔵学”，1 版，朝倉書店，東京，(1949)，pp. 131.
5) J. G. BAUMGARTNER: “Canned Food”, J. A. CHURCHILL LTD., LONDON (1949), pp. 99～120.

魚肉ソーセージの軟化現象について—Ⅱ.

軟化部位から分離された細菌について

横関源延・内山　均・馬見塚利明
（東海区水産研究所）

日本水産学会誌
第二十四巻第二号別刷
昭和三十三年六月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, No. 2, June 1958

魚肉ソーセージの軟化現象について—II.
軟化部位から分離された細菌について

横関源延・内山　均・馬見塚利明
(東海区水産研究所)

The Softening Deterioration of Fish Sausage—II.
Microbiological Studies of the Softening Deterioration

Motonobu Yokoseki, Hitoshi Uchiyama and Toshiaki Mamizuka
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

It has been shown in the preceding paper[1] that the softening deterioration of fish sausage is different from the usual spoilage of fish meat or other fish jelly products like Kamaboko. The present study aims at making clear the problem how the microorganisms play in the softening deterioration of fish sausage. The number of the colonies of microorganisms growing during the ordinary agar plate culture increases always to a higher extent in the softened portion (about 10^7 in 1g. of sample) than in the not-softened (below 10^4 in 1g.). The microorganisms thought likely to cause this spoilage were isolated from various samples, allowing the identification of three strains according to Bergey's manual (1948).

From the results of morphological and physiological experiments, the strains are almost wholly identified as *Bacillus circulans* excepting some physiological properties as shown in Tables 1, 2, 3, and 4. All the strains may thus be looked upon as facultatively anaerobic and characterized by their resistance to heat as seen in Table 5.

魚肉ソーセージの変敗現象にはいろいろな型式が観察され，軟化現象もその一つであることを前報[1]で述べた。

この場合の軟化部位を直接塗抹して検鏡したところ，非軟化部に比べて，はるかに多数の有芽胞桿菌の存在することが観察された。そこで，ある種の細菌が繁殖したためにこのような現象がおこるのであろうと推察し，軟化現象を呈した製品を集めて軟化部位に存在する細菌を分離し，その性質を調査したので報告する。

実 験 方 法

1. 分離試料

菌分離に供した魚肉ソーセージは，軟化変敗をおこして返品になつた製品を集めたものである。

分離細菌株とそのソーセージ製造会社，製造時期，原料の配合割合，分離した時期などはつぎのとおりである。

YE 株: Y 社製，1956 年 6 月 4 日製造
クロカワカジキ，メカジキ，ワラズカ，キンキ，サケ，ホッケ肉に馬鈴薯澱粉 5%，豚脂 5%，nitrofurylacrylamide と nitrofurazone の混合物 (neofuraskin) 1/5,000，その他香辛料，食塩等添加，85°C 45 分加熱，10 月 18 日分離。

NN 株: N 社製，1956 年 9 月 14 日製造
マグロ，サケ肉に馬鈴薯澱粉 5～8%，豚脂 10%，砂糖 1.5%，nitrofurylacrylamide と nitrofurazone の混合物 (neofuraskin) 1/4,000～1/5,000，その他食塩，香辛料等添加，85°C 45 分

1958 年 1 月 21 日受理
東海区水産研究所業績 B-280

加熱，11 月 16 日分離。

HEM 2 株： H 社製，1957 年 5 月 30 日製造

クロカワカジキ，バチマグロ肉に馬鈴薯澱粉 10%，nitrofurylacrylamide と nitrofurazone の混合物 (neofuraskin) 1/10,000，その他香辛料，食塩等添加，90～95°C 40 分加熱，6 月 10 日分離。

2. 細菌の分離方法

常法により casing の表面に alcohol を塗拭し殺菌後，更に火焔をくぐらせ，滅菌メスで切り開いた。軟部を集めて稀釈平板による好気培養と，thioglycolic 酸高層培地による嫌気培養とを行つた。

培養温度は 34°C，培養後生じた colony を観察したところ，殆んど同一種と思われたが，念のため好気，嫌気両培養からそれぞれ 8～15 株を分離した。その細菌学的性質を調べたところ，同一会社製品からの細菌は少くも同様な菌種であると断定されたので，各分離試料の代表株についての性質を記載することにする。

分離用培地：

好気培地　peptone 10g，肉エキス 5g，食塩 30g，glucose 10g，寒天 15g，水 1,000cc，pH 7.0.

嫌気培地　好気培地に thioglycolic 酸 0.5cc を加える。

食塩を特に 3% 添加したのは，魚肉ソーセージは普通 3% 前後の食塩を含んでいるからである。また魚肉ソーセージの酸化還元電位は一般に Eh で −0.2～−0.3 volt 附近である。thioglycolic 酸を glucose 寒天培地に 0.05% 加えると Eh −0.280 volt となり，ほぼ魚肉ソーセージの電位に近くなるので，これを嫌気培地とした。

3. 分類学的方法

従来一般に行われている方法[2),3),4)]によつて実施した。なお特記しない限り培養温度は 34°C である。

4. 死滅温度

寒天斜面に 34°C 10 日間培養して，できるだけ胞子のみになるようにした（栄養菌体は完全にはなくならない）colony をかきとり，M/50 phosphate buffer (pH 7.0) に浮游させ，この胞子濃度を血球計算器で確かめておく。

試験管に 10cc つつ入つた分離用嫌気培地（寒天培地）をあらかじめ溶かして，目的とする温度に保つておき (100°C 以上の場合は 100°C にする)，これに胞子懸濁液を 10cc 中 10^4 になるように加えて一定時間加熱した。一つの test について 2～4 本の培地を用い，同時に接種して加熱実験を行つた。加熱終了後直ちに冷水で冷却し，34°C に 10 日間培養して生死を観察した。

実 験 結 果

非軟化部の細菌数は 1g 中 10^4 以下であるのに対し，軟化部は 10^7 程度で，明かに細菌の繁殖が認められた。つぎに分類学的性質を示す。

各 Table には，分離菌に最も近いと思われる *Bacillus circulans* の記載[5)]との比較を示した。

Table 1. Morphological characters

Strains	Rods		Sporangia	Spores		Motility	Gram Stain
	Form	Size (μ)		Form and Location	Size (μ)		
YE	rod	0.5～0.8×1.8～2.9	distinctly bulged, clavate	spherical, terminal	0.7～1.2	+	+
NN	〃	0.4～0.7×1.7～2.8	*ditto*	*ditto*	1.1～1.3	+	+
HEM 2	〃	0.4～0.6×1.6～3.0	*ditto*	*ditto*	1.0～1.3	+	+
B. circulans	〃	0.5～0.9×2.0～5.0	*ditto*	ellipsoidal, central to terminal	0.8～1.2×1.1～2.0	+	variable

1. 形態的性質 (Table 1)

YE, NN, HEM 2 株何れも gram 陽性で運動性ある有胞子桿菌である。球形の spore を菌端に形成し，sporangia はその部位で大きく膨大してラケット状を呈する。spore の形成は 24 時間では僅少であるが，48 時間後から盛んになる。分離直後はよく spore を形成するが，長く継代培養を繰り返すと次第に形成能力が悪くなる傾向がある。

2. 培養的性質 (Table 2)

普通寒天培地によく生育し，寒天培地に密着した硬くて薄い colony を作る。白金耳でこの colony を掻きとる場合，寒天面からはなれ難い性質を持つている。長く培養すると，YE 株は培地を褐色に変じ，NN 株は僅かに変化させるが HEM 2 株は変化させない。この点が各菌株間の主な相違点である。

Table 2. Cultural characters

Strains	Agar Colony	Agar Slant	Nutrient Broth	Potato
YE	circular, smooth, lobate, flat, opaque, dull, adherent	filiform, smooth, flat, dull, adherent, medium becoming brownish	pellicle, slightly turbid with flocculent sediment	no growth
NN	*ditto*	filiform, smooth, flat, dull, adherent, medium slightly brownish	*ditto*	*ditto*
HEM 2	*ditto*	filiform, smooth, flat, dull, adherent, medium unchanged	*ditto*	*ditto*
B. circulans	the colonies of the rougher or mucoid strains are small, entire, non-spreading	mucoid strains are dens, non-spreading, entire, gummy and adherent	slightly to fairly turbid with flocculent to slimy sediment	very variable

3. 生理的性質 (Table 3, 4)

Table 3 に表したように，分離した菌株は何れも同様な性質を示した。すなわち硝酸塩を還元せず，また indol 並びに acetylmethylcarbinol も生産しない。硫化水素を生成し，澱粉をよく分解する（沃度反応の消失）。リトマス牛乳培地をゆるやかに凝固させ，gelatin をよく溶解する。発育温度の範囲は広く，25°～

Table 3. Physiological characters

Strains	Production of			Voges-Proskauer Test	Citrate Assimilation	Hydrolysis of Starch
	Nitrite	Indol	H_2S			
YE	−	−	+	−	−	+
NN	−	−	+	−	−	+
HEM 2	−	−	+	−	−	+
B. circulans	+			−	−	+

Strains	Action on Milk	Liquefaction of Gelatin	Relation to O_2	Relation to Temperatur	
				Opt. Temp.	Max. Temp.
YE	acid, slowly coagulated	stratiform liquifaction	facultatively anaerobic	30～37°C	55°C
NN	*ditto*	*ditto*	*ditto*	30～37°C	55°C
HEM 2	*ditto*	*ditto*	*ditto*	30～37°C	55°C
B. circulans	usually acid, slowly coagulated	slow cone-shape liquifaction (Jordan), no liquifaction (Ford)		30°C	52°C

Table 4. Fermentation of sugars (Peptone-ammonium medium)

Strains	Glucose	Fructose	Galactose	Mannose	Lactose	Sucrose	Maltose	Raffinose	Arabinose	Xylose
YE	+	+	+	+	±	±	+	±	+	±
NN	+	+	+	+	±	±	+	±	+	±
HEM 2	+	+	+	+	±	±	+	±	+	±
B. circulans	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Note: No gas production detected in all strains
+····Acid production positive
±····Acid production slightly positive

55°C でよく生育するが，最も良好な発育を示すのは 30°～37°C である。glucose 寒天を溶かしておき，これに分離菌を懸濁し，冷却してその発育層を観察したところ，深部発育は他の *Bacillus* 属例えば *B. subtilis*, *B. cereus* 等と比較して極めて良好であつた。また嫌気培養にもよく生育する。糖類の醱酵は試みた糖全部から酸を生成し，gas を生じなかつた。

4. 死滅温度 (Table 5)

加熱温度は 95°, 100°, 105°, 110°, 115°C について試験した。100°C 以上の加熱には autoclave を使用したので，目的の温度に達する迄と，常圧に下がる迄に 100°C 以上に約 10 分程度加熱されていることになる。95°C に加熱した場合に，後培養で生育して来る colony の数は次第に少くなるが，70 分加熱を続けても肉眼で数え得る程度に少くはならない。100°C 60 分でようやく colony を数え得る程度に少くなるが，完全死滅は望めない。105°C で 20 分，110°C では 10 分で完全に死滅し，115°C では即時に死滅する。

Table 5. Thermal death time (Inoculation, 10^4 spores per 10cc agar-medium)

Temp. (°C) / Time (min) / Strains	100			105		110	115
	10	50	60	10	20	0*	0*
YE	## ## ## ##	+ + + +	− − ±(1) ±(1)	±(4) ±(2)	− −	±(2) ±(1)	− −
NN	## ## ## ##	+ + + +	±(3) ±(3) ±(6) ±(8)	±(8) ±(17)	− −	±(2) −	− −
HEM 2	## ## ## ##	+ + + +	±(5(±(9) ±(12) ±(10)	±(4) ±(5)	− −	− −	− −

Note: * Heating was stopped on the arrival of the specified temperature
Alive in a large number
+ Alive in a moderate number
± ( ) A few survived; Arabic numerals in parentheses show number of colonies in 10cc medium.

考　　察

魚肉ソーセージの軟化変敗部分から分離される菌は，製造月日，原料配合組成，工場などが全く個々別々である試料から分離した細菌でありながら，上述の様に互に極く近似の性質をもつている。強いてその相異を挙げれば，YE 株が普通寒天培地を褐色に変化させ，NN 株はわずかに変色させるのに対し，HEM 2 株では全く変化がみられないという点に過ぎない。その他の性質は全く一致するから，同一の菌種に属するものと考えられる。

分離菌の性質を BERGEY'S Manual[5] によつて検索してみると，spore を持つた桿菌であつて，好気的によく生育するのであるから *Bacillus* に属することは明かである。*Bacillus* は mesophilic と thermophilic

に大きく別けられるが，分離菌は 30°C にも 55°C にも良く生育する。しかし thermophilic は 37°C 以下では発育が微弱で，aerobic であるとの記載があるが，分離菌は 30°C にもよく生育し，anaerobic にも充分生育するので mesophilic 群に属する菌と考えた。mesophilic 群は spore と sporangia の形態等により，A, B, C の三群に別けられている。分離菌の spore は球形であつて，形態を重要視すれば C 群に属するわけであるが，C 群は炭水化物を分解しないのに対し分離菌は多種類の炭水化物を分解する。著者等は生理的性質を重要視して B 群に属するものと判定した。つぎに分離菌は炭水化物から gas を産生しない，普通寒天培地によく生育する，glucose peptone broth 培養の pH を 5.5 にし，炭素源として citrates を利用しない，澱粉を加水分解し，sucrose から酸を生産する，arabinose から明かに酸を生成し acetylmethylcarbinol を生産しない等の諸性質からすると *Bacillus circulans* になるのであるが，完全には一致しない。しかし spore の形態が球形であることと nitrate を還元して nitrite にしないことを除き，他の性質は殆んど一致するから *Bacillus circulans* JORDAN に近い菌と考える。

ところでこのような軟化菌の汚染源は不明であるが，今迄の研究によると，木俣[6] はねり製品の副原料として普通用いられているイモ澱粉の細菌学的研究において，80°C 10 分で死滅しない菌のうち *B. circulans* は *B. megatherium* についで多いことを報告している。また著者の一人[7] はかつて焼竹輪の加熱直後に残存する菌のうち約 10% の割合で *B. circulans* が存在していることを観察している。もつともこのような菌株が今回の分離菌と同様に軟化現象を起すかどうかは全く判らない。

最近魚肉ソーセージに用いられている各種の香辛料並びに澱粉中に存在する菌のうち，80°C 45 分の加熱に耐え，しかも前述の嫌気培地に生育する菌数を調査してみたところ，corriander, allspice, white pepper, ginger 等から 1g 中 10^3～10^4 程度の菌が発育してくる。したがつて，軟化菌の来源を考える場合には，当然このような香辛料や澱粉等からの汚染を考慮する必要があろう。

魚肉ソーセージの加熱温度は普通 85°～95°C で 40 分から 1 時間程度である。分離菌は上述の寒天培地中では 100°C 以下の加熱では死滅しなかつた事実から考えると，魚肉ソーセージにこのような菌が混入した場合には完全には死滅しないであろうことが推察できる。

要　　約

1) 軟化現象を起した魚肉ソーセージを集めて，その軟化部位から細菌を分離し，その分類学的研究を行つた。

2) 軟化部位には非軟化部に比べると，いずれの場合もはるかに多数の有芽胞桿菌が存在する。

3) 全然別の工場で製造された製品であるにもかかわらず，三ケ工場製の製品から分離された軟化原因菌はいずれも同様な性質を持ち，*Bacillus circulans* に属する菌であつた。

4) 分離菌の胞子はいずれも 100°C 60 分では死滅せず，105°C 20 分の加熱でようやく死滅する。

文　　献

1) 内山均・田中武夫：本誌，**24**, p.　　(1958).
2) Society of American Bacteriologist: "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria", Geneva, N. Y. (1955).
3) 東大農芸化学教室："実験農芸化学"，上巻，5 版，朝倉，東京，(1956), pp. 174～227.
4) 伝研学友会："細菌学実習提要"，9 版，丸善，東京，(1956), pp. 114～169.
5) R. S. BREED, E. G. D. MURRAY and A. P. HITCHENS: "BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology", 6th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore (1948).
6) 木俣正夫・河合　章：本誌，**16**, 55 (1951).
7) 横関源延・大島　浩：北海道水産試験場研究報告，No. 7, 1 (1950).

魚肉ソーセージの軟化現象について—Ⅲ.
軟化原因細菌及び数種の *Bacillus* 属による澱粉の嫌気的分解

内山　均・横関源延・本橋光太郎
（東海区水産研究所）

日本水産学会誌
第二十四巻　第五号　別刷
昭和三十三年九月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 24, No. 5, Sept. 1958

魚肉ソーセージの軟化現象について—Ⅲ.
軟化原因細菌及び数種の *Bacillus* 属による澱粉の嫌気的分解

内山 均・横関源延・本橋光太郎
(東海区水産研究所)

The Softening Spoilage of Fish Sausage—III.
An Anaerobic Starch Digestion by *Bacillus circulans* Isolated from Softened Part of Fish Sausage and Other *Bacillus* Species.

Hitoshi Uchiyama, Motonobu Yokoseki and Kootaro Motohashi
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

In the previous paper, the authors reported the nature of softening spoilage of fish sausage as well as the characteristics of the causative microorganism which was identified as *Bacillus circulans* according to its morphological and physiological findings.

After a culture of *Bacillus circulans* and other *Bacillus* species was suspended in a physiological saline solution, the suspension was heated for 45 minutes at 85°C in order to kill the vegetative cell, and 0.5 cc portion of the suspension was inoculated in the fish sausage paste which was sterilized beforehand.

Then the mixture was incubated anaerobically in a jar filled with hydrogen gas.

The softening, very alike to those found in the commercial product, was also observed in culture of *Bacillus circulans* kept at 30° to 34°C.

Some starch granules were found crumbled down around the normal granules in microscopic examination of the softened portion, as described in the previous report.

While the case of *Bacillus subtilis* or *Bacillus cereus*, none of the softening was noticed for the samples treated in the same way.

Certain difference in the nutritional requirements or the presence of inhibitors for spore germination would be explored for these kinds of bacteria. (Table 1).

In this connection, the capability as to the digestion of starch was investigated for *Bacillus circulans* and other Bacilli, as shown in the Tables 2 and 3.

A liquid culture medium, containing extract of fish flesh, peptone, 1 per cent of potato starch and with or without 0.5 per cent of glucose, was employed under strict anaerobic condition as mentioned above.

A remarkable increase in the activity of breaking down starch was observed rather more in aerobic culture than in anaerobic one as will be seen in Table 2.

On the contrary, for the case of *Bacillus circulans*, predominant consumption of starch was developed under anaerobic condition and in the medium purposely absent of the glucose as shown in Table 3.

To ascertain the extent of digestion of starch, sodium periodate was reacted to the alcoholic precipitates obtained from the culture after thrice repetition of precipitation and the amount of formic acid thus released was determined with 0.01 N NaOH solution required to titrate the acid.

Table 4 indicates that the alkali number for *Bacillus circulans* is much higher than those of other organisms.

1958 年 5 月 7 日受理
東海区水産研究所業績, B第 285 号

Furthermore, the color intensity of iodine reaction seems to have a correlation to the amount of formic acid derived.

A clear-cut divergence in the spectrum of iodine reaction of the degraded starch was found between *Bacillus circulans* and other species; the absorption maximum for the former was 5800 Å and the latter 6000～6200 Å, as seen in the Table 5.

It is quite certain, from our findings that some *Bacillus* group is really capable to grow under anaerobic circumstance.

In 1957, Puziss, who observed the growth of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* in an anaerobic jar displaced the air with nitrogen gas, reported that these organisms readily develop both in synthetic and nonsynthetic medium containing glucose respectively.

And it is well known fact that 'flat-sour spoilage' or 'off-flavor' happened in canned foods is frequently caused by certain facultative thermophile, one of the *Bacillus* group.

Attention should be also paid to the potato starch and various kinds of submaterial, usually incorporate in fish sausage, because these soil born stuffs are fairly contaminated with thermotolerant Bacilli.

On the other hand, the condition customaly adopted in cooking of fish sausage product, that is the temperature at 85～90°C. for about 50 minutes, would not be drastic enough to kill the bacterial spores completely. Therfore, certain number of the spores will inevitably survive in the commercial products.

前報[1)2)]で魚肉ソーセージの軟化現象の特徴，その原因細菌等について報告した。軟化部分の澱粉粒子を顕微鏡観察すると，弾力の補強剤としての粒子が，周囲から消化されており，あたかも細胞の原形質分離が行われているような様相を示し，これが軟化の原因と考えられること，また，軟化原因細菌は *Bacillus circulans* に酷似した性質を示す細菌であること等を明かにした。

Bacillus に属する細菌は，一般に強力な amylase をもつている。しかし，これらの細菌が魚肉ソーセージの如き，その内部が嫌気的であるような環境下で，どの程度の作用を示すか。これは軟化との関連において重要であろう。

今回は，これ等の点を中心に，分離した軟化原因細菌及び数種の *Bacillus* 属を用いて，2，3 の検討を行つたので，その結果を報告する。

実 験 方 法

1. 細　　菌

使用した細菌はつぎの 13 種である。

1) *Bacillus mesentericus* (F)
2) *Bacillus subtilis* (F)
3) *Bacillus subtilis* PCI 219
4) *Bacillus subtilis* Bact 1—8
5) *Bacillus megatherium* Bact 1—2
6) *Bacillus cereus var mycoides* IFO 3039
7) *Bacillus* firmus
8) *Bacillus coagulans*
9) *Bacillus circulans* (YE)
10) *Bacillus circulans* (NN)
11) *Clostridium sporogenes* A 3679
12) *Clostridium welchii*
13) *Pseudomonas fluorescens* NRRL B′—6′

1, 2, 13 の菌株は腐敗研究所，3, 5, 6 の菌株は応用微生物研究所，4, 11, 12 は予防衛生研究所よりそれぞれ分与されたものであり，その他は著者等の研究所で魚肉ソーセージより分離したものである。軟化原因細菌は，9, 10 の *Bacillus circulans* であることは第 2 報で述べた如くである。

Bacillus 属を培地に接種する時は，生理的食塩水 5 cc に一白金耳とり，80°C 45 分加熱し，その浮遊液 1 cc～1.5 cc を培地に加えた。そして同時に，この浮遊液を一白金耳とり普通寒天培地の斜面に接種して，実験のつど好気培養を行い，芽胞存在の確認を行つた。加熱を 80°C 45 分としたのは，普通魚肉ソーセー

ジ製造の際に行われている加熱であると同時に，*Bacillus* 属の vegetative cell を殺菌するに充分な温度と考えられるからである。

Cl. sporogenes. *Cl. welchii* 及び *Ps. fluorescens* は嫌気培養の条件の判定に用いた。

2. 澱粉添加培地

Peptone 5 g, 肉エキス 10 g, NaCl 30 g と馬鈴薯澱粉 10 g を水 1 *l* に溶解，pH 7 に修正して大型試験管に 50 cc づつ分注し，3 日間，間歇殺菌して用いた。澱粉の分解は glucose の如き単糖類の共存下では著しく影響されようとの推定から，この影響をみるためには，同上の培地に glucose を 0.5 % になるように加えて，同様に殺菌して用いた。

3. 嫌気培養法

二重コックを 2 個所に有するヂャー* の中で行つた。内部の空気を排除し，水素でこれを置換させた。置換操作は 3 回くりかえし，指示薬として methylene blue を入れ，それが脱色される条件で行つた。更に，このように操作したヂャー内部の嫌気的状態が，満足すべきものであるかどうかの吟味のために *Cl. sporogenes*. *Cl. welchii* 及び *Ps. fluorescens* を普通寒天培地に接種して検討した。即ち，前 2 者はよく生育してくるが，後者は全くコロニーの形成がみられなかつた。この方法は PUZISS[3] 等が *Bacillus* の嫌気的条件における糖代謝の研究に用いたものに準じたものである。

4. 澱粉の定量

培地一定量に，2 倍量の ethanol を加えて攪拌し，遠心分離する。再びこれを温水に溶解，冷後，更に ethanol を加える。この操作を 3 回くりかえし，沈澱した澱粉を 20 cc の水に溶解し，25 % HCl 2.0 cc を加えて常法により加水分解する。生成した glucose を HANS 法により測定し，この値より澱粉量を算出した。

5. 過沃素塩酸による澱粉の酸化

過沃素塩酸を用いて，多糖類の結合位置を知ることは有効な方法[4] として広く用いられている。例えば，Fig. 1. に示す如く，過沃素酸ソーダが amylose に作用した場合分子の末端から三分子の蟻酸が生ずる。

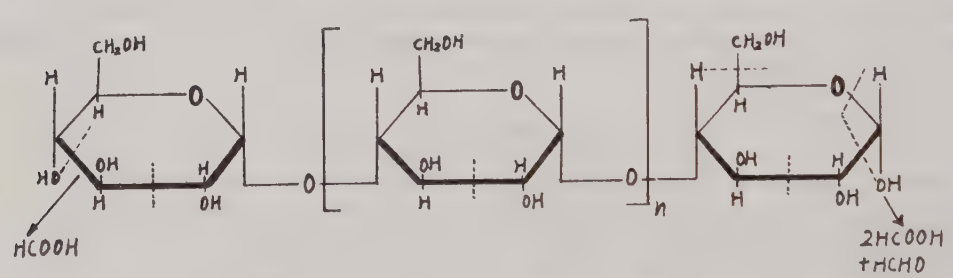


Fig. 1. Periodate oxidation of amylose

そして末端以外の結合は 1, 4 結合であるために蟻酸の放出は行われない。amylopectin のように，分子の分岐部分の glucose が 1, 6 結合よりなるものは，隣接する 3 個の炭素に 3 個の OH 基が結合することとなり，過沃素酸塩はこの場合中間の OH 基を蟻酸として放出させる。

澱粉が分解され，低分子となると同時に末端基の増大が伴えば，過沃素酸酸塩によつて酸化され，蟻酸として放出される量も増加されねばならない。このことから培地中に残存している消化澱粉の分解程度を比較することは，蟻酸を定量することによつて可能となる。

過沃素酸塩には，メタ過沃素酸ソーダ ($NaIO_4$) を用いた。市販には，当試薬がないので LANGLOIS[5] の方法によつて合成した。その反応はつぎの如くである。

$$Na_3H_2IO_6 + 2HNO_3 \rightarrow NaIO_4 + 2NaNO_3 + 2H_2O$$

---

* 細谷の嫌気ビンと略同様なもの，細菌実習提要，pp 99，丸善（東京）

パラ過沃素酸ソーダ ($Na_3H_2IO_6$) は入手しやすく，これを出発物質とする時は，比較的簡単に $NaIO_4$ を得ることができる。

酸化の方法は POTTER[6] の記載に準じた。即ち，培地より前述した方法で分離した消化澱粉 0.50 g を 10 cc の 3% NaCl に溶解，これに 0.37 M $NaIO_4$ 10 cc を加え，ガラス球を数個いれて，共栓三角フラスコの中で 24 時間振盪器にかけた。温度は 2°～5°C の冷蔵庫中で行つた。

振盪が終つたら，試料 10 cc をとり ethylen glycol 1 cc を加え 30 分放置し，過剰の $NaIO_4$ を分解する。これに窒素ガスを通じつつ 0.01 N NaOH で phenolred を指示薬として滴定した。

消化澱粉の測定と同時に対照として *Bacillus* 属を接種しないもの及び馬鈴薯の amylose と amylopectin をそれぞれに測定した。

6. 消化澱粉の沃素反応及びその吸光極大の測定

澱粉中の glucose の重合度と沃素反応とは密接な関係がある。従つて各種の菌株による消化澱粉の消化の程度は沃素反応の吸光曲線を測定することによつて推定できる。

培地より，前述の分離方法によつて得た消化澱粉に 0.01 N 沃素溶液を加え，一定時間後，同一条件によつて吸光極大を測定した。測定には日立製作所製 recording spectrophotometer を用いた。

実 験 結 果

1. 軟化原因細菌を殺菌した魚肉ソーセージの摺身に接種した場合の軟化の再現性

軟化部分から分離した細菌が *B. circulans* に近い性質を示し，これが軟化原因細菌であるとすれば，本細菌を接種した魚肉ソーセージは，当然軟化の再現性がなくてはならない。

ソーセージの摺身を試験管につめて殺菌し，Table 1. に示す細菌を接種する。即ち，各細菌を生理的食塩水 5 cc に一白金耳とり，80°C 45 分の加熱後，この浮遊液 0.5 cc を接種し，前述のチャーの中で 30°～34°C で培養，軟化の有無と pH を測定した。尚，浮遊液中の芽胞の存在は前述した方法で確認しておい

Table 1. The softening spoilage developed by the spores of *Bacillus* species after they are inoculated anaerobically on the sterilized fish sausage paste.

No.	Micoroorganisms tested	10-day		30-day	
		Occurrence of softening	pH	Occurrence of softening	pH
1	Control	−	6.30	−	—
2	*B. mesentericus* (F)	−	6.19	−	6.35
3	*B. subtils* (F)	−	5.95	−	5.83
4	*B. megatherium* Bact 1-2	−	6.03	−	6.10
5	*B. cereus var mycoides* IFO 3039	−	6.09	−	6.06
6	*B. subtilis* Bact 2-8	−	6.11	−	6.24
7	*B. firmus*	−*	5.51	−*	5.60
8	*B. coagulans*	−	6.10	−	6.13
9	*B. circulans* (YE)	++	5.32	++	5.40
10	*B. circulans* (NN)	++	5.25	++	5.41

* Became strongly sour

た。

B. circulans は 2 例とも著しい軟化を形成し，摺身の接種部分である上部から下部にかけて軟化が進行している。この軟化部分の澱粉粒子は，第 1 報で報告したように周囲が消化した様相を示していた。同時に培養した，*Cl. sporogenes*. *Cl. welchii* も著しい腐敗を示した。

しかし，他の *Bacillus* 属は全く軟化を形成しないしその pH も著しい変化のないことが判る。*B. firmus* の場合は，軟化というよりも液汁が離漿し著しい酸敗を伴つた。以上のことから，軟化原因菌である *B. cir-*

culans は，魚肉ソーセージの中にあつて特異的な作用を示すものであることが判る。

2. Glucose の共存下における *Bacillus* 属の好気及び嫌気性培養による澱粉の分解及び揮発性塩基窒素の形成

澱粉と glucose を添加した前述の培地に，数種の *Bacillus* 属を加熱処理し，その浮遊液を接種して 30°～34°C で 30 日好気培養，及び嫌気培養した。その澱粉，揮発性塩基及び pH を測定した結果，Table 2. に示す値が得られた。

Table 2. Starch digestion and volatile basic nitrogen formation by *Bacillus* species under aerobic or anaerobic condition.
(0.5 per cent of glucsoe was added to each medium)
A 30-day incubation at 30°–34° C.

No.	Microorganisms tested	Aerobic culture			Anaerobic culture		
		pH	Starch mg in 10 cc of medium	Volatile basic nitrogen mg %	pH	Starch mg in 10 cc of medium	Volatile basic nitrogen mg %
1	Control	7.25	(100)*	8.0	—	—	—
2	*B. mesentericus* (F)	7.60	66.8	28.7	5.45	60.8	10.1
3	*B. subtilis* (F)	6.78	15.1	37.6	5.39	63.2	11.8
4	*B. megatherium* Bact 1-2	5.69	7.7	32.5	7.17	66.4	8.4
5	*B. cereus var mycoides* IFO 3039	5.90	29.6	17.9	5.89	53.3	9.7
6	*B. subtilis* Bact 2-8	6.41	7.6	43.5	5.46	60.8	12.2
7	*B. firmus*	7.75	2.0	25.7	5.78	39.8	9.5
8	*B. coagulans*	7.56	11.1	33.1	5.30	77.6	11.0
9	*B. circulans* (YE)**	5.45	82.1	9.6	5.36	59.3	9.4
10	*B. circulans* (NN)**	5.30	73.6	8.5	5.30	67.6	8.3

* Amounts of added starch in 10 cc of medium.
** Organisms isolated from softened portion of commercial fish sausage.

一般に好気培養の場合は，嫌気培養に比較して，残存澱粉量は少なく，その分解は速である。しかし，軟化原因細菌である。*B. circulans* は 2 例とも，むしろ嫌気培養において分解能が増大される傾向を示している。即ち，好気培養における残存澱粉量は 82.1 mg (YE) と 73.6 mg (NN) であるのに，嫌気培養においては，それぞれ 59.3 mg, 67.6 mg の値を示している。

揮発性塩基窒素の形成量には全体を通じて顕著な差が認められる。8.5～43.5 mg の範囲にある好気培養に比較して嫌気培養では 8.4～12.2 mg の範囲にすぎない。pH は逆に嫌気培養において低下しやすいことが判る。

3. Glucose 無添加培地における *Bacillus* 属の嫌気培養による澱粉の分解

培地は前述のものから，glucose を除いた以外まつたく同様であり，培養操作も同一に行つた。

Table 3. でみられるように，*B. mesentericus*, *B. firmus* の場合を除き，澱粉単一培地の方が分解されやすい傾向がある。このことは，軟化原因細菌である *B. circulans* においては一層明かとなる。即ち，Table 2. の glucose 添加の嫌気培養の場合は，30 日でまだ 59.3 mg (YE) と 67.6 mg (NN) の澱粉を残すが，澱粉単一の場合は 4.2 mg (YE) 7.3 mg (NN) (Table 3. No. 9, 10) と著しく残存澱粉量は減少する。このように，軟化原因細菌が嫌気的条件で強い澱粉分解作用のあることは，ソーセージの軟化部分の澱粉粒子が消化されている事実と併せて興味ふかい。

pH は glucose 添加の場合に比較して，一般に高い値を示している。恐らく酸の形成は澱粉のような多糖類からよりも glucose のような単糖類からの方がより形成されるためであろう。

Table. 3. The anaerobic starch digestion and volatile basic nitrogen formation by *Bacillus* species.
(Medium without glucose)
A 30-day incubation at 30°–34° C.

No.	Micoroorganisms tested	pH	Starch mg in 10 cc of medium	Volatile basic nitrogen mg %
1	Control	7.45	(100)*	5.3
2	*B. mesentericus* (F)	7.41	98.8	5.0
3	*B. subtilis* (F)	5.72	51.7	10.0
4	*B. megatherium* Bact 1–2	7.45	47.5	4.2
5	*B. cerens var mycoides* IFO 3039	6.00	35.6	10.3
6	*B. subtilis* Bact 2–8	5.99	28.3	9.2
7	*B. firmus*	7.40	69.7	8.5
8	*B. coagulans*	7.55	62.2	7.2
9	*B. circulans* (YE)**	5.45	4.2	6.9
10	*B. circnlans* (NN)	5.50	7.3	7.1

* Amount of added in 10 cc of medium.
** Organisms isolated from softened portion of commercial fish sausage.

Table 4. Sodium periodate oxidation of starch digested by *Bacillus* species.

No.	Microorganisms tested	0.01 N NaOH (cc) as titer for 0.5 g of sample
1	Control	17.1
2	*B. snbtilis* Bact 1–8	24.1
3	*B. cereus var mycoides* IFO 3039	22.9
4	*B. circulans* (YE)*	56.7
5	*B. circulans* (NN)*	56.3
6	Amylose (Potato)	1.3
7	Amylopectin (Potato)	11.8

* Organisms isolated from softened portion of commercial fish sausage.

4. メタ過沃素酸塩($NaIO_4$)による消化澱粉の酸化

実験方法の5で述べた方法により，消化澱粉の分解程度を比較するために，Table 3. で行つた消化澱粉のうち，*B. subtilis* Bact 1～8，*B. subtilis* および *B. circulans* の(YE)と(NN)の消化澱粉について $NaIO_4$ による蟻酸の形成量を比較したところ，Table 4. に示すような結果が得られた。

対照に用いたamyloseは試料 0.50mg 当り 1.3cc，amylopectin は 11.8 cc，そして細菌を接種しない培地より分離した澱粉は 17.1 cc の値を示した。そして *B. subtilis* Bact 1～8 及び *B. cereus* を接種した場合，それぞれ 24.1 cc 及び 22.9 cc の値であるが，軟化原因細菌の場合は 56.7 cc (YE) 及び 56.3 cc (NN) の値を示し著しく蟻酸の形成量が大であることが判る。

5. 消化澱粉の沃素反応及びその吸光極大

過沃素酸ソーダによる蟻酸の形成量から軟化原因細菌は，他の *Bacillus* 属に比較して，極めて amylase 作用が強力であることが推定された。これを追試する意味とどの程度まで澱粉を分解するかの比較のため，Table 5. に示す細菌を用いて検討した。

培養法及び澱粉の分離方法は，これまでの実験と略同様に行つたが，培養は 10 間，34°C とした。

細菌を接種しない対照及び比較に用いた *Bacillus* 属の消化澱粉は，沃素反応青色を示し，吸光極大 6000～6200 Å を示した。しかし，軟化原因細菌，*B. circulans* は2例とも官能的にも明に紫色の沃素反応を示し，且つその吸光極大は 5800 Å を示した。即ち，明かに他の *Bacillus* 属の場合より低分子の glucose 単位にまで分解が進行したものと推定される。

考　　察

一般に，好気性有芽胞桿菌として問題にされる傾向のある *Bacillus* 属が，嫌気的にも生育し得ることについては，すでに 2, 3 の報告がある。

BUSHNELL[7] (1922) は，2, 3 の *Bacillus* 属の生育が減圧した環境下でもよく発育し得ることを，缶詰の変敗との関連において明かにしている。PUZISS[3] は，*B. cereus* 及び *B. anthracis* を嫌気的に培養し，両者ともかかる環境下で glucose より乳酸，蟻酸，或は酪酸を形成することを確認し，且つ，このような環境下では，芽胞の形成は行われないとしている。

Table 1. The absorption maximum of iodine reaction of potato starch digested by *Bacillus* species.
A 10-day incubation at 30°-34° C.

No.	Microorganisms tested	Color tone of the iodine reaction	Absorption maximum
1	Control	Blue	6200 Å
2	*B. cereus var mycoides* IFO 3039	Blue	6100
3	*B. coagulans*	Blue	6200
4	*B. mesentericus*	Blue	6200
5	*B. subtilis* PCI 219	Blue	6000
6	*B. circulans* (YE)*	Royal purple	5800
7	*B. circulans* (NN)*	Royal purple	5800

* Organisms isolated from softened portion of commercial fish sausage.

缶詰の変敗に flat-sour 或は off-flavours[8] と称するものがある。これらは facultative *Bacillus* といわれている細菌に原因する1種の酸敗であり，実際問題からも重要視されている。したがつて，缶詰と類似点のある魚肉ソーセージにおいても，このような *Bacillus* 属が嫌気的に作用し，特殊の変敗を起すことは，当然あり得ると見なければならない。

Table 2. に示した如く，pH は好気的培養に比較して嫌気培養では低下しやすい。特に glucose の如き糖類を加えた場合には顕著である。嫌気的状態においては糖代謝的な作用が増大して，それを基質とした中間代謝生産物としての酸が蓄積されるからであろうが，このことは魚肉ソーセージの変敗に，軟化も含めて極めて酸敗が多いことと関係がある。

本実験と平行して，製造直後の魚肉ソーセージを商社別に 50 例ほど検討したが，30°C で約 30 日貯蔵後，酸敗製品は 30 % 以上に達した。

第2報[2] で述べた如く，ソーセージの副原料としての澱粉，或は香辛料は *Bacillus* 属の汚染度が極めて高い。それに加えて，魚肉ソーセージの加熱処理は 80°～95°C であり，これらの *Bacillus* 属の芽胞が死滅せずに残存する危険は充分に考えられるのである。

魚肉ソーセージの貯蔵性は，他の煉製品に比較して安定なものであるが，それを過大に評価する傾向がないでもない。著者等は以上の観点から，これを長期の貯蔵食品とするには，いまのところ未だ無理があるように考える。

嫌気的状態に魚肉を放置した場合，揮発性塩基窒素の増大は認められないことは，2, 3 の研究者によつて確められている。魚肉ソーセージも同様なことが認められるのであるが，*Bacillus* 属を好気，或は嫌気的に培養した場合も，Table 2. 3 に示した如く，嫌気培養の場合は殆んど揮発性塩基の増大は認められない。恐らく，嫌気的状態においては，NH_3 形成のための O_2 のような hydrogen acceptor を欠如することに起因して，その形成が阻止されるのであろう。包装食品は，単に二次的の細菌汚染を防止するだけでなく，内部の酸素分圧を低下さすことにも，貯蔵の意義があろう。

軟化原因細菌が，嫌気状態において，他の *Bacillus* 属に比較し，明かに amylase 作用が強力であることは，Table 2. 3. の結果から検討しても間違いなかろう。そして，残存澱粉の $NaIO_4$ による蟻酸の生成量からしても他の *Bacillus* 属による残存澱粉と比較して，その glucose の重合度は小さいと考えられる。消化澱粉を amylose 或は amylopectin 区分に分割していないので，蟻酸の形成量から直ちに重合度を算出することはできないが，沃素反応の吸光極大の比較から，以上の推定は確かめられる。

SWANSON[9] は直鎖の dextrin を重合させ，同時に沃素反応を行い，重合度とその沃素呈色との関係を検

討しているが，平均重合度 29～34 の場合は紫色となり，吸光極大は 5800 Å あるとしている。

沃素反応の青い呈色は，澱粉中の直鎖分子である amylose 区分に支配されることから考え，少なくとも，Table 5. に示す如く，軟化原因細菌の消化澱粉の吸光極大が 5800 Å を示すことはその直鎖分子は重合度 29～34 の程度と考えられる。また当消化澱粉が他のそれに比較して極めて水に溶解しやすいことは，青色を示す他の *Bacillus* 属による消化澱粉より著しく低分子の dextrin と推定することができよう。(沃素反応青色，6000 Å で最低重合度 55～146 の値が与えられている。また，直鎖の amylose は数百の重合度でも青色を示す)。

殺菌魚肉ソーセージに軟化原因細菌を接種した場合，酸の形成を伴い軟化の形成がみられるが，他の *Bacillus* 属を接種した際は，Table 1. にみられるように，軟化が形成されない。この点については検討中であるが恐らく芽胞の germination と関係していると考えている。例えば，芽胞の代りに vegetative の cell を接種した場合は，軟化非形成の *Bacillus* 属でも軟化を形成することがある。いずれとしても，魚肉ソーセージより *B. subtilis*. *B. cereus* 等が分離されているにもかかわらず，軟化部分からは *B. circulans* が特異的に分離されることと併せて興味あることと思う。

報告するに際し，懇切な御注意を下さつた天野慶之博士に厚く御礼申し上げるとともに amylose. amylopectin の入手に御便宜いただいた大阪大学，二国二郎教授に厚く御礼申し上ぐ次第である。

要　　約

1) 軟化原因細菌 *Bacillus circulans* を殺菌ソーセージに接種すると，軟化の再現性が認められる。しかし *B. subtilis*. *B. cereus*. *B. megatherium*. *B. coagulans* 等では軟化は起らなかつた。

2) 軟化原因細菌 *Bacillus circulans* 及び数種の *Bacillus*. 属 (*B. subtilis*. *B. megatherium*. *B. mesentericus*. *B. cereus*. *B. coagnlans*. *B. firmus*) を用いて，好気或は嫌気培養による澱粉の分解作用を検討した。

3) 好気培養では，一般に嫌気培養に比較して，澱粉分解作用が増強されるが，軟化原因細菌は，むしろ嫌気培養において増強される傾向がある。

4) 嫌気状態での澱粉分解作用は glucose が共存すると抑制されるが，軟化原因細菌は特にこの影響に対して顕著である。

5) 軟化原因細菌は，澱粉分解作用が顕著であるばかりでなく，それを低分子にまで分解する作用が，他の *Bacillus* 属に比較して著しいことを，過沃素酸ソーダ ($NaIO_4$) による末端基酸化法によつて検討した。

6) 軟化原因細菌による消化澱粉は，沃素反応，紫を呈し吸光極大 5800 Å を示した。他の *Bacillus* 属によるものは 6000～6200 Å を示し，明かに軟化原因細菌は低分子の dextrin にまで澱粉を分解さす作用が強力である。

7) 魚肉ソーセージは *Bacillus* 属によつて汚染される危険は極めて多い (澱粉，香辛料)。そして，その加熱処理では，とうていこれらの細菌芽胞を完全に死滅さすことは困難である。本製品の貯蔵性を過大に評価する傾向があるが，それを期待するには，更に改良が必要である。

参 考 文 献

1) 内山均，田中武夫：本誌，24，2，pp. 148～155 (1958).
2) 横関源延，内山均：本誌，24，2，pp. 156～160 (1958).
3) M. Puziss, S. Crittenberg: Journal of Bacteriology 73, pp. 48～51 (1957).
4) D. Glick: "Methods of Biochemical Analysis", (1945), pp. 190～194.
5) 奥野久輝："無機化合物標準合成法"，非凡閣，東京，(1945)，102.
6) A. L. Potter: Journal of American Chemical Society, 70, 3488 (1948).
7) L. D. Bushnell: Journol of Bacteriology, 7, pp. 283～300 (1922).
8) J. G. Baumgartner: "Canned Foods", (1949), pp. 99～120. (J. & A. Churchill. LTD. London).
9) M. A. Swanson: Journal of Biological Chemistry, 172, 825 (1948).

ねり製品の内部腐敗に関する研究—Ⅲ.
ねり製品の酸化還元電位

横関源延
(東海区水産研究所)

Studies on the Internal Spoilage of Fish-Jelly Products—III.
Measurement of Oxidation-Reduction Potential in Fish-Jelly Products

Motonobu Yokoseki

It has been reported in the preceding paper that strict aerobes failed to grow inside of fish-jelly products, where the growth of certain facultative anaerobes or facultative aerobes took place and that the presence of an anaerobic state could be presumed in the structure of the food.

This time, in order to ascertain the relation, oxidation-reduction potential was determined as an index of anaerobic condition kept in various kinds of fish-jelly products.

The measurement was done electrometrically with a Beckman pH meter, attached with a platinum-calomel electrode system, as shown in Fig. 1. The oxidation-reduction potential found in Hanpen, a very soft and porous fish-jelly, was only an exception which indicated positive value, while the most of other items such as Kamaboko, Satsumaage and fish sausage showed Eh between −0.100 and −0.250 volts or rH value of 4.5 to 9.7 (Table 2).

It is quite understandable that these observed change in the oxidation-reduction potential during storage was much more remarkable near the surface of the products than the core of those, where the initial value was being kept for a pretty long time.

Particularly, fish sausage which generally stuffed in rather impermeable casing, made of rubber hydrochloride or vinylidene chloride film, showed a very stable value of oxidation-reduction potential even in the sample tested after two weeks' storage.

前報[1]において，魚肉ソーセージの製造直後に残存する細菌のうち，製品内部で繁殖し得ない細菌は，嫌的条件では生育できない好気性菌であり，一方製品中で繁殖する細菌は嫌気，好気両条件のもとで生育す通性嫌気性菌であつたことから，ねり製品の内部は嫌気的状態になつている可能性のあることを推察した。細菌学において，嫌気的状態を表わすには普通酸化還元電位 (O-R. P) が用いられている。偏性嫌気性菌充分に繁殖を起すには Eh−0.2 ボルト以下の O-R. P が必要であるといわれている。

食品の O-R. P については酒類の熟成，変色，臭等と O-R. P との関係についての多数の報告[2]があるが，製品の O-R. P を取扱つた研究は少い[3),4)]。

今回は前報の推察を確めるために，各種ねり製品の O-R. P を電気的に測定し，普通ねり製品内部は Eh (−) 側にあることを確めたので報告する。

実験方法

(1) 酸化還元電位の測定

O-R. P の測定には Fig. 1 に示したように白金−甘汞系を用いた。白金電極，甘汞電極は共に Beckman

1958 年 9 月 17 日受理　東海区水産研究所業績 B 第 296 号

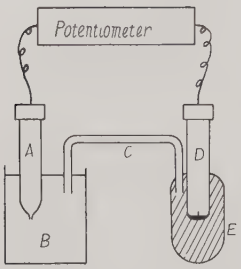


Fig. 1. Diagram of the apparatus used for the measurement of oxidation-reduction potential in fish-jelly products.
A: Saturated calomel electrode
B: Saturated KCl solution
C: Agar salt bridge
D: Platinum electrode
E: Sample

の製品で，potentiometer も Beckman model G の pH 計をそのまま使用した。

ねり製品摺身を直径約 32 mm の塩化ビニリデンケーシングに詰め，この中心部に白金電極を静かに挿入し，挿入口をケーシングの上から電極と共に綿糸で結索した。このようにした製品をそのまま一定の温度に調節した湯浴に一定時間漬けて加熱し，冷水に投入して急冷後，ケーシングを取り去り，試料に寒天橋を挿入して測定した。

加熱後の製品に電極を挿入した場合には安定した電位が得られず，また終局電位[5]を得るのに長時間を要したので，この方法は用いなかつた。

白金電極はまず中性洗剤でよく洗浄し，次にベンゼン，稀い塩酸，蒸溜水の順で洗つてから使用した。

（2） 電位測定装置の検定

上記測定装置がはたして正しい電位を示しているかどうかを検討するために，次のような実験をして確めた。

Table 1. Test for the purpose of certification of the apparatus used in this study.
Eh value when the indicator developed its characteristic color in agar medium (pH 7.0, 30°C).

Oxidation-reduction indicator	Values actually measured	Values given by some other observers[6]	E_0'
Methylenblue	− 0.059	− 0.05	+ 0.011
Indigocarmin	− 0.160	− 0.15	− 0.125

ブドウ糖 1%，チオグリコール酸 0.05%，酸化還元指示薬（0.05% 溶液）0.5%を加えた pH 7.0 の普通寒天培地を加熱溶解して小型試験管に入れ，ただちに電極を挿入して冷却凝固させる。一たん還元脱色された指示薬は冷却後，表面より再酸化されて着色してくる。白金電極の白金部分の周囲が着色し始めた時の電位を読み，この値を文献値と比較した。その結果を Table 1 に示した。表に示したように結果は文献値[6]と殆んど一致し，この測定装置が正しい測定値を与えることを示している。

実 験 結 果

1. 各種ねり製品の酸化還元電位

上記実験法に述べた方法によつて，各種のねり製品の O-R. P を測定した結果を Table 2 に示した。

Table 2. Oxidation-reduction potential in various kinds of fish-jelly products (20°C).

Sort of fish-jelly products		Processing temperature	Eh (volts)	pH	rH	Specific gravity
Hanpen	A	75°C, 40 min.	+ 0.068	6.15	14.6	0.872
〃	B	〃	+ 0.285	6.10	22.0	
Satsumaage		85°C, 40 min.	− 0.152	6.20	7.1	1.045
Kamaboko	A	75°C, 40 min.	− 0.122	7.00	9.7	1.080
〃	B	〃	− 0.219	7.08	6.5	
Fish-sausage	A	85°C, 40 min.	− 0.094	6.20	9.1	1.039
〃	B	〃	− 0.138	6.25	7.7	1.050
〃	C	〃	− 0.251	6.63	4.5	

O-R. P の測定には同一試料について，二つの測定系を作つて実験したが，殆んど一致し，比較的再現性のある結果を得ることができた。試料は主として東京附近の製品を用い，同一種類の製品で A, B, C とあるのは別々の工場で製造されたものである。ハンペンはヨシキリザメを主原料としたもの，サツマアゲはアオザメ，メジロザメ，ヨシ

キリザメを原料とし，カマボコは白グチ単用のいわゆる小田原カマボコである。魚肉ソーセージAはクロカワカジキ単用の製品，Bはクロカワカジキにキハダマグロ，バチマグロ等が混入されている。Cはクロカワカジキ単用の製品である。製品中に存在する気泡の多少を表わすために，径約 2.1 cm，高さ 2.0 cm の小型カップに，摺身をしぼり出し器を用いて気泡の入らないように均一に詰めて秤量し，同容積の水の重量との比から算出して，一応比重として示した。

Table 2 に示したように，気泡をたくさんに混入したハンペン（ヤマノイモを加えてできるだけ多く気泡を含ませた製品である）は他の製品に比較して，はるかに比重が小さく，例外なく電位も高い。Eh で +0.068 ～ +0.285 ボルト，rH では 14～22 という値を示している。これに対しハンペン以外のカマボコ，魚肉ソーセージ等の電位はいずれも（−）側にあつて，Eh −0.094 ～ −0.251 ボルト，rH 4～10 というように極めて低い値を示している。小田原カマボコのように充分に晒された魚肉によつて作られた製品の電位は高いのではないかと最初予想したのであるが[4]，この結果によるとかならずしも晒された製品の電位が高いとはいい得ないようである。魚肉ソーセージは一般に晒さないで作られているにもかかわらず，比較的電位の高い製品も見られる。

2. 放置中における酸化還元電位の変化

Table 2 に示した電位はいずれも加熱直後の電位を測定したものであるが，一般に製品表面は魚肉ソーセージを除き，直接空気に接触している。したがつて空気中の酸素の影響により，表面部は速かに電位が上昇し，内部の電位の上昇はそれより遅れることが推察される。そこで組織の荒いハンペンと組織の緻密な小田原カマボコについて，放置中の電位の変化を測定した（Fig. 2）.

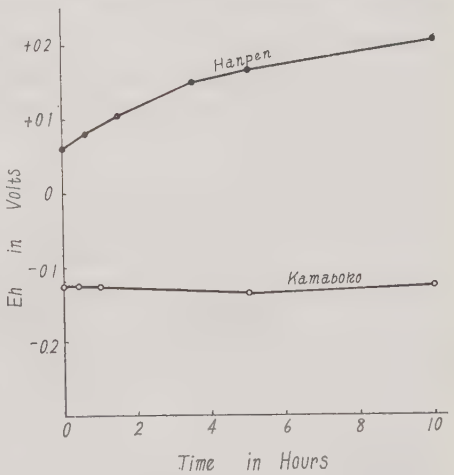


Fig. 2. Time-potential curve for Hanpen and Kamaboko.

Fig. 2 で明かなように，小田原カマボコの中心部は 10 時間後にも殆んど電位が変化しないのに対し，ハンペンは急速に電位が上昇する。

ハンペンは他のねり製品に比較して，気泡を多く含み組織が荒いので[7]，表面からの酸素の滲透が速かなためであろう。小田原カマボコはねり製品の中でも，弾力が強いといわれている製品で，また組織も緻密である[8]。したがつてガスの滲透も遅れることは充分考えられる。表面から酸素の影響を受けて，徐々に電位が上昇していく様子を見るために，次のような実験を試みた。

摺身に色別できる程度に 0.5% メチレンブルー溶液を混入し，径 32 mm のケーシングに詰めて加熱した。加熱によりメチレンブルーは完全に還元されて無色になる。冷却後ケーシングを取ると表面は再酸化されて直ちに着色し，放置しておくと着色層はリング状に徐々に内部に向つて進む。ケーシングを取り去つた時を基準として，一定時間毎に製品を輪切りにして着色層の幅を測定した結果が Fig. 3 である。

ハンペンは Table 1 に示したように電位が高く，メチレンブルーは還元されないので，第二燐酸カリ（K_2HPO_4）で pH を 7.5 に調整し，更にブドウ糖 2% を添加して電位を人工的に下げて実験した結果である。

Fig. 3 の結果によつても，ハンペンは速かに中心部まで酸化着色される。他の製品はある程度の深さまでは割合に速かに着色するが，その後は酸化がなかなか進行しない。この現象は Reed 等[9]が培地に寒天を加えると電位が安定するという事実や Lepper 等[4]が培地の粘稠性が表面からの酸素の浸入を阻害するという報告とよく一致する。

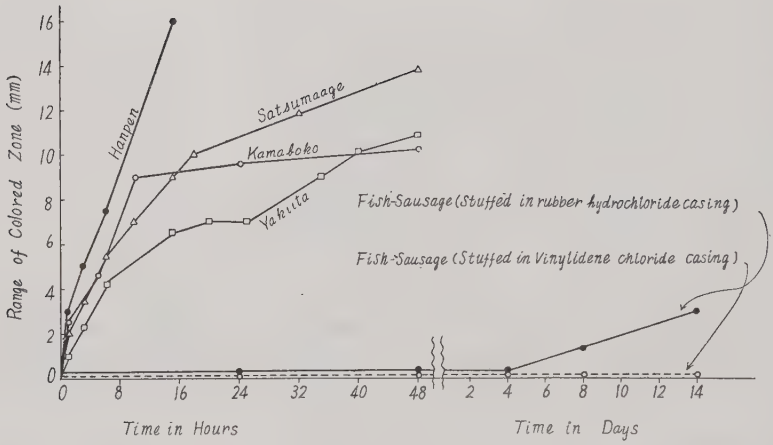


Fig. 3. Change of colored zone for reoxidized methylenblue in various kinds of fish-jelly products.

包装された魚肉ソーセージ類はケーシングにより酸素の浸入を防いでいるので，長期間にわたつて低電位を維持している。殊に興味あることは，ガス透過性の極めて小さいといわれている[10]塩化ビニリデンケーシングは塩酸ゴムケーシングより，内部電位の変化を防止する力が強いことである。即ち塩化ビニリデンケーシングにより包装された製品が，14 日目でも全然着色しないのに対し，塩酸ゴムケーシングの製品は約 3mm の深さまで酸化着色している。このような結果から，放置中の製品の電位に影響を及ぼす主な要因は空気中の酸素であることが判る。

メチレンブルーの標準 O-R. P は Eh +0.011 ボルト，着色し始めの O-R. P は pH 7.0 で大体 Eh 0～−0.05 ボルトである[6]。Fig. 3 に示した着色層は少くも O-R. P が Eh 0 以上であることを示している。しかしメチレンブルーのような酸化還元指示薬は poising action があり，その指示薬の標準 O-R. P に近ずけようとする性質があるので，自然に放置した場合より，多少電位の上昇が早くなる傾向があるのでないかと考える。この現象は製品中にある poising action を持つ物質の量によつて左右されることは勿論である。

考　　察

予想した通り，ねり製品内部の O-R. P はハンペンを除き，いずれも低く（−）側にあることが明かとなつた。ハンペンは気泡を多く含み，したがつて比重も極めて小さいので，電位の高いのは当然であろう。しかし，ハンペンのように比重の極端に小さい製品は別として，他の製品については比重だけで電位を予想することはできないようである。やはり摺身中に存在する還元性物質の量によつて決定されるのであろう。

魚肉が加熱されると，肉中の不飽和脂肪酸が酸素を吸収するという LEPPER 等[4]の報告や，還元性物質が増加するという藤巻等[11]の報告がある。しかし摺身の時既に電位がかなり低い事実は，メチレンブルーを摺身に混入する簡単な実験によつても，色素は還元されてしまうことから明かに証明できる。

CASTELL[3], LEPPER 及び MARTIN[4]によると，このような肉製品が低電位になる原因は，(1) 機械的に或は生活細胞の呼吸による溶存酸素の除去，(2) 種々な物質の還元力により，(3) 微生物の分解により基質から遊離される還元性物質や，金属或は酸化還元性系酵素によるためであると述べている。今回報告したねり製品の嫌気状態の出現も，結局上述のような作用に，更にねり製品の場合添加される砂糖，味淋等の調味料の影響が加わつた結果であると考えられる。

ねり製品を無包装のままで放置しておくと，外気に接する表面から電位は徐々に上昇していく。その速度は還元性物質の量や物理的な組織の疎密によつて異るようであつて，ハンペンのように組織の荒い製品は電

位の上昇も早い。ねり製品のいわゆる弾力はこのような性質にも影響を及ぼしているようである。

ねり製品を包装すれば空気の接触を防ぎ，内部の O-R. P の上昇をかなり防止することができる。殊に酸素不透過性のフィルムを用いれば，内部の電位は相当長期間にわたつて，低電位を維持することができるようである。

ねり製品の内部がこのような低電位であるとすれば，内部に残存している偏性好気性菌が，その後繁殖できないのは当然といわなければならないし，通性嫌気性の *Bacillus* 類も好気的な状態とはちがつた代謝作用を示すことが予想される。

摘　　要

1) 種々のねり製品内部の酸化還元電位を電気的に測定した。

2) ねり製品の中でもハンペンの電位は特に高く，Eh で +0.068～+0.285 ボルト，rH では 14～22 である。これは他の製品に比較して多量の気泡を含んでいるためと考えられる。

3) ハンペン以外の製品の電位はいずれも低く，Eh −0.094 ボルト，rH で 10 以下であつた。

4) ねり製品を放置しておくと，表面から次第に電位が上昇する。その速度はハンペンが特に早い。ハンペン以外の製品は或る程度の深さまでは比較的速かに電位が上昇するが，中心部の電位は仲々上昇しない。

5) ガス透過性の低いフィルムを用いてねり製品を包装すると，ねり製品の電位は相当長期にわたつて低電位を維持する。

終りに種々御懇切な御指導をいただいた天野慶之博士，酸化還元電位の測定にあたり重要な御示唆をいただいた東大農学部熊田恭一博士，本研究所右田正男博士，公衆衛生院高瀬明氏に厚く感謝の意を表する。

文　　献

1) 横関源延：本誌，**23**，543～546 (1958).
2) 宮路　昇・柏原健二：農化，**30**，485～488 (1956).
3) C. H. Castell: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **7**, 567～575 (1950).
4) E. Lepper and C. J. Martin: *Brit. J. Exp. Path.*, **10**, 327～334 (1929).
5) 田宮　博・奥貫一男・山口清三郎・山本　篤：生体酸化還元，pp. 333 (1935)，裳華房，東京.
6) L. F. Hewitt: Oxidation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry, pp. 23 (1950), E. & S. Livingstone LTD, Edinburgh.
7) 内山　均・天野慶之：本誌，**20**，830～834 (1955).
8) 岡田　稔・右田正男：本誌，**22**，265～268 (1956).
9) G. B. Reed and J. H. Orr: *J. Bact.*, **45**, 309～320 (1943).
10) Plastic Encyclopedia, pp. 862～865 (1955).
11) 藤巻正生・小田切　敏・稲垣長典：本誌，**18**，703～708 (1953).

γ線を照射した水産食品に含まれる油脂の性状について—I.

金田尚志・酒井寿恵・石井清之助
(東海区水産研究所)

Chemical Properties of Oils in Gamma-Radiated Fish Meat and Products—Part I.

Takashi Kaneda, Hisae Sakai and Seinosuke Ishii

When fish or its products are subjected to the gamma radiation for preservation, their taste is often degenerated, and there are reasons to assume that this is caused by changes in chemical properties of oil contained in fish. The aim of the present study is to find out means, if any, to avert the degeneration of the taste in as much as the assumption is proved true. In the experiments conducted for this purpose, the authors have found that when the fatty abdominal meat of tuna is exposed to the gamma radiation from a cobalt—60 isotope (radiation dose 1,000,000 r), it shows a dark brown color with an offensive ordor, the oil of the meat turning rancid (Table 2). On the other hand, fish sausages irradiated did not show, despite the presence of an amount of fat, any remarkable changes as to palatability (Table 3 and 4).

I. 緒　　言

γ線照射により食品を貯蔵せんとする場合，まず問題となることの一つにその食品の風味が照射により損われないか？ということがある。すなわち，γ線を当てることにより長期間の貯蔵がたとえ可能となつても，風味が損なわれていては食品としての価値は失われてしまう。

γ線を照射した食品の含有成分の変化については従来既に多くの報告が出されているが，水産食品に関するものは比較的少い。また従来の報告には五感検査により風味の変化を検討したものが多く，例えばProctor等[1]はHaddockにつき，Nickerson等[2]はサバ，Shewan[3]はHaddock，サバ等について報告している。またGroningen等[4]は窒素ガス中においてサケ，Halibut，マグロ等を照射し，色素の消失，風味の低下を認めている。しかし以上の報告を通じていえることは水産食品に含まれる個々の成分の変化についての検討が比較的少いということである。

筆者等はγ線を照射した水産食品の風味にかなりの影響を与えると考えられる含有油脂の性状について試験し，油脂の変化の程度を調べるとともに，油脂の変化に起因する風味の低下があるとすればその防止法を見出したいと思い本研究を開始した。

前記のごとく水産食品に含まれる油脂のγ線照射による変化についてはあまり報告がないが，食用油脂およびこれを構成する脂肪酸の変化については既にかなりの報告が出されている[5-11]。これ等の報告を見ると何れも沃素価の低下，分子量，過酸化物価の増大を認めている。

以上の結果を参考として考えると不飽和度の高い油脂を含む水産食品は一層変敗しやすいと思われる。

筆者等はまず Co^{60} を線源として大豆油に大略200万レントゲンのγ線を照射したところ，過酸化物，共役酸が増加し，従来の報告と全く同一の結果を得た。またこの際，淡黄色を示していた大豆原油は退色しほとんど無色となつた。次にマグロのトロ身を用いて試験したところ，色は暗黒褐色となり，悪臭を生ずると共に含有油は変敗した。但し，この際，予め抗酸化剤を添加しておくと，この変敗はかなり防止し得ることを認めた。また魚肉ソーセージを照射した場合は変敗の程度が少く十分利用し得ることを知つた。

1958年9月12日受理
東海区水産研究所業績 B 第297号

II. 実 験 の 部

実験 1. 市販大豆油照射結果:

市販大豆油を経 15 mm の試験管に空気を残したまま封入し，Co^{60} を線源として 10 cm の距離より室温(23°C前後)で 49 時間，196 万レントゲンを照射し次の結果を得た。(カーボニル化合物の含量は Henick 等[12]の方法によつた)

本結果を見るに照射大豆油は退色したほかは香り，味などには一見未照射のものと区別がつかなかつた。しかし，Table 1 に示すごとく，過酸化物，共役酸，カーボニル化合物などは増加し，酸化が進んでいるこ

Table 1. Chemical changes in irradiated soybean oil
第 1 表 大 豆 油 照 射 結 果

Radiation dose 照射量	Acid value 酸価	Iodine value 沃素価	Sap. value 鹸化価	Peroxide value (M.M./kg.) 過酸化物価	Conjugated acids (%) 共役酸 Diene デイエン	Triene トリエン	Tetraene テトラエン	Reichert-meissl value ライヘルトマイスル価
None (control) 未照射(対照)	0.6	131.1	189.7	19	0.26	0.026	0.004	0
1960000γ	0.8	128.8	188.1	110	0.36	0.029	0.004	0

Table 2. Properties of oil contained in irradiated fatty meat of tuna
第 2 表 γ 線照射クロマグロトロ肉中の粗脂肪の性状

Radiation dose 照射量	Acid value 酸価	Iodine value 沃素価	Sap. value 鹸化価	Peroxid value (M.M./kg.) 過酸化物価	Conjugated acids (%) 共役酸 Diene デイエン	Triene トリエン	Tetraene テトラエン	Reichert-meissl value ライヘルトマイスル価
None (control) 未照射	2.5	157.6	189.0	34	0.92	—	—	0.3
1000000γ	13.4	155.0	187.3	103	1.15	—	—	0.9
1000000γ (B.H.A. added) B.H.A. 添加	1.5	155.0	185.2	43	1.68	—	—	2.7

Table 3. Properties of oil contained in irradiated fish-sausage*
第 3 表 γ 線照射魚肉ソーセージ含有油の性状

Radiation dose 照射量	Acid value 酸価	Iodine value 沃素価	Sap. value 鹸化価	Peroxide value (M.M./kg.) 過酸化物価	Conjugated acids (%) 共役酸 Diene デイエン	Triene トリエン	Tetraene テトラエン	Reichert-meissl value ライヘルトマイスル価
None (control) 未照射(対照)	2.7	77.5	190.9	58	0.40	—	—	0.3
1600000γ	4·4	75.8	186.1	110	0.48	—	—	0.8

* Commercial products irradiated at the laboratory.

Table 4. Properties of oil contained in irradiated fish-sausage*
第 4 表 γ 線照射魚肉ソーセージ含有油の性状

Radiation dose 照射量	Acid value 酸価	Iodine value 沃素価	Sap. value 鹸化価	Peroxide value (M.M./kg.) 過酸化物価	Conjugated acids (%) 共役酸 Diene デイエン	Triene トリエン	Tetraene テトラエン
None (control) 未照射(対照)	2.2	73.3	193.1	78	0.47	0.005	—
1600000γ	1.8	71.9	195.5	86	0.22	—	—
1600000γ (B.H.A. added) B.H.A. 添加	2.1	72.8	193.5	70	0.50	0.002	—

* Prepared at the laboratory before irradiation.

とがわかる。

実験 2. マグロ肉照射結果:

クロマグロのトロ身を厚さ 1 cm, 縦 4 cm, 横 5 cm に切り, ポリエチレンの袋に詰め口をシールして線源のまわりに衝立状に並べ 9 cm の距離より Co^{60} を用いて前試験同様照射した。この際の室温は 28°C 前後, 照射時間は 20 時間で線源に近い面は 100 万レントゲン, 裏面は 90 万レントゲンを当てた計算となる。また Butylated hydroxyanisol (B. H. A.) の 1/5000 溶液に 1 時間浸漬したトロ身を同一条件のもとに照射した。

これ等照射した試料の性状を見ると, 抗酸化剤添加の有無にかかわらず照射したトロ身はいずれも暗黒褐色となり, 異臭を帯び, 到底食用となし得ないような状態となつた。また照射肉および未照射のものをそれぞれ細切し, 無水芒硝と混和脱水後, 精製エーテルを用いて粗脂肪を分離し, その性状を検討したところ Table 2 のごとき結果を得た。

Carbonyl micromols/g. カーボニル化合物		Color. 色調	
Saturated 飽和	Unsaturated 不飽和	y	R
2.99	4.05	0.86	0.20
3.91	4.71	0.66	0.20

本結果を見るに 100 万レントゲンを照射したトロ身中の粗脂肪は酸価, 過酸化物, 共役酸, ライヘルトマイスル価, カーボニル化合物などが増加した。ただし抗酸化剤を添加した場合は酸価, 過酸化物価などの増加がかなり防止されることを認めた。

実験 3. 市販魚肉ソーセージ照射結果:

市販魚肉ウインナ・ソーセージ (豚脂入り) を 11 cm の距離より 53 時間照射し, 保蔵性の延長を計らんとし, 線源に近い部分に 160 万レントゲン, 裏面は 130 万レントゲンを照射した。本試料を山田[13]が 30°C の恒温器中に貯蔵したところ, 1 ケ月後未照射のものはゼリー状に軟化する部分を生じたが照射したものは未変化であつた。

Polenske value ポレンスケ価	Carbonyl micromols/g. カーボニル化合物	
	Saturated 飽和	Unsaturated 不飽和
	5.9	1.3
1.2	21.0	12.0
0.7	15.6	20.2

照射ソーセージは色素が退色し, 魚肉本来の色に近くなつたが, 風味はあまり変らず十分食用となし得た。また前試験同様含有油を分離し, その性状調べたところ Table 3 のごとき結果を得た。

Polenske value ポレンスケ価	Carbonyl micromols/g. カーボニル化合物	
	Saturated 飽和	Unsaturated 不飽和
0.6	5.4	3.1
1.4	5.55	2.65

本結果を見るに照射したものは外観的には殆んど変化を認め得ないにもかかわらず過酸化物価および揮発酸などを増し, いくぶん酸化されていることを認めた。

実験 4. 抗酸化剤添加ソーセージ照射結果:

魚肉ソーセージはγ線照射によりそれほどひどい変化を受けぬが, さらに未変化のものを製造するため抗酸化剤を添加した。すなわち, メバチマグロ, クロカワカジキ, サメ, イカなどの摺身に木酢液および B. H. A. 1/5000 を添加した豚脂 10 %を加え, 直径 1 cm のウインナソーセージ用塩酸ゴム袋に詰め, 90°C の温水中に 1 時間浸漬したものを試料とした。また対照としては B. H. A. を添加しない豚脂を混じたものを使用した。照射条件は前試験同様である。これ等照射ソーセージは抗酸化剤添加の有無にかかわらず, いずれも前試験同様あまり悪影響を受けず食用となし得るような状態であつた。含有油の性状は Table 4 のごとくで, 抗酸化剤添加の効果はそれほど明らかでなかつた。これは原料肉に既に木酢液が混じてあり, これの効果があつたためとも考えられる。

Reichert-meissl value ライヘルトマイスル価	Carbonyl micromols/g. カーボニル化合物	
	Saturated 飽和	Unsaturated 不飽和
1.1	2.7	7.35
0.3	1.7	6.17
1.9	1.3	7.28

III. 考　　察

以上の結果より考察するにγ線照射により水産食品を貯蔵す

るにはなお多くの問題があることが判る。すなわちマグロのトロのごとく油脂含量の多い魚肉は筆者等の行つたような実験条件では到底食用となし得ない。すなわち，筆者等は 28°C もの室温で 20 時間にわたり γ 線を 100 万レントゲン照射したが，このような温度で長時間照射を行い，しかも線源があまり強くないため当然照射中に魚肉中に含まれる酵素の作用とか腐敗が進行すると考えられる。そのため魚肉中の油脂もソーセージのごとく加熱したものにくらべると一層変敗したものと思う。

なお山田[14]の試験結果によるとイカ，ヒラメのごとく油脂含量の少いものは変敗の程度が少く十分食用となし得るというが，含油量の多い魚を鮮魚のまま照射するには低温で行う必要があろう。また窒素，炭酸ガスなどの注入とか真空照射などの影響についても検討する必要があると考えられる。すなわち，塩酸ゴムの袋に詰めたソーセージよりポリエチレンの袋に入れた生肉の方が変敗しやすいのはポリエチレンの通気性に起因する点もあるように思われるが，これ等は今後に残された問題である。

ソーセージについてはある程度の加熱殺菌が行われており，また酵素の影響もないため多脂肪な生鮮魚肉に認められるほどの悪変は起らず γ 線の照射により保存期間をさらに延長し得ると思われる。しかし，現在使用しているような色素は退色してしまうため，この点についてはさらに検討する必要があろう。

Ⅳ. 摘　　要

Co^{60} を線源とし生鮮魚肉および魚肉ソーセージに γ 線を照射した場合の含有油脂の性状について試験し，次の結果を得た。

（1） クロマグロのトロ身に室温（28°C）で生肉の貯蔵可能と考えられる程度（100 万レントゲン）の γ 線を照射すると変色し異臭を生ずると共に含有油脂の変敗を生じた。

（2） 魚肉ソーセージについては殆んど悪影響は現れず利用し得るものと思われる。

本研究を行うにあたり御指導を賜つた東海区水産研究所利用部長東秀雄博士，γ 線を照射した山田金次郎氏，原料魚肉を提供された日本冷蔵明石工場長相馬豊造氏に謝意を表する。

文　　献

1) B. E. Proctor and D. S. Bhatia: Food Tech., **4**, 357 (1950).
2) J. T. R. Nickerson, S. A. Goidblith and B. E. Proctor: Food Tech. **4**, 84 (1950).
3) J. M. Shewan: Unpublished data. From "Department of scientific and industrial research, food investigation special report. No. 61, Scientific and technological problems involved in using ionizing radiations for the preservation of food by human. London, 1955, p 119.
4) H. S. Groninger, A. L. Tappel and F. W. Knapp: Food Research **21**, 555 (1956).
5) C. W. Sheppard and V. L. Burton: J. Am. Chem. Soc. 68, 1636 (1946).
6) V. L. Burton: J. Am. Chem. Soc. **71**, 4117 (1949).
7) J. F. Mead: Science **115**, 470 (1952).
8) J. Greenfied: Am. Paint J. **41**, 84 (1956).
9) O. F. Batzer, M. Sribney, D. M. Doty and B. S. Schwigert: Agr. and Food Chem. **5**, 700 (1957).
10) J. R. Chipault, O. S. Privett, G. R. Mizuno and W. O. Lundberg: Ind. Eng. Chem. **49**, 1713 (1957).
11) H. T. Slover and L. R. Dugan Jr.: J. Am. Oil Chem. Soc. **34**, 333 (1957).
12) A. S. Henick, M. F. Benca and J. H. Mitchell: J. Am. Oil Chem. Soc. **31**, 88 (1954).
13) 山田： 未発表
14) 山田： 未発表

無機塩によるアサリ毒の変質

右田正男・神名孝一
（東海区水産研究所）

Deterioration of the Shell-Fish Poison "Venerupin" by Inorganic Salts

Masao Migita and Koichi Kanna
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

In the previous paper the authors have shown that shell-fish poison "Venerupin", found in the livers of short-neck clam and oyster in Hamana Lake, when added into sea water, cannot be recovered without effecting a serious loss. In the usual course of recovery the solution is evaporated on a water-bath at 60°C. But this cannot be considered as a primary cause, for the poison has been proved to be stable against heat. Thus the authors were led to the assumption that salt might be responsible for the loss of poison. In order to ascertain this a series of experiments were carried out with the following results.

1. When the shell-fish poison was added to 1～3% NaCl solution and recovered from it, 60% of the original toxicity was lost (Table 2, A). The loss of the poison was amounted to 80%, when recovered from 30% NaCl solution (Table 2, B). On the other hand the poison was recovered without any loss from the aqueous solution (Table 2, 0).

2. After the shell-fish poison was kept saturated with an excess of salt for two different periods, it was recovered by direct extraction with 99% MeOH. Thus it was avoided to evaporate up aqueous solution of the poison in the presence of NaCl. The toxicity was found to be considerably decreased even by a short contact with NaCl and the decrease became more and more pronounced on a prolonged contact (Table 3).

3. In order to avoid heating the poison in the presence of salt, the shell-fish poison was added to 5% saline solution and its toxicity was assayed without extracting the poison. No loss of the poison was observed if the poison was kept in the saline solution only for a short time, while decrease in toxicity was observed either on heating the solution at 100°C. for 30 min., or on prolonged storage (over 3 days) of the solution (Table 4).

4. Salts caused loss of the poison in the following order, when it was recovered from dilute salt solutions (Table 5)

$$Na_2SO_4,\ K_2SO_4 > KCl > NaCl\ .$$

5. If the poison was ground with salts, diluted with water and assayed without being extracted, salts lowered toxicity of the poison in the order

$$Na_2SO_4\ \text{anhyd.} > NaCl > K_2SO_4\ ,$$

K_2SO_4 having scarcely any effect (Table 6).

6. Na_2SO_4 showed such an intense effect that a definite loss of the poison was observed by mere dissolution of the poison in 5% Na_2SO_4 solution (Table 6 note***).

As to the reason for decrease in toxicity caused by mere dissolving the poison in a dilute salt solution, some physiological effect of salt on mice can be left out of consideration. Because the shell-fish poison is not of an acute nature, and because it was actually proved in the cases of NaCl (Table 3) and K_2SO_4 (Table 6) that injection of the poison together with a dilute salt solution did not necessarily cause decrease in toxicity.

1958 年 5 月 19 日受理
東海区水産研究所業績 B 第 286 号

In conclusion, salts seem likely to produce such a change in the shell-fish poison as to decrease its toxicity. This change is facilitated by heat. Thus in working with the shell-fish poison one must always mind about the possibility of deterioration of the poison due to coexistent inorganic salts.

緒　　言

アサリ毒は極めて不安定なものらしく，種々の試薬によつて変質し毒性を失つたり，その中毒症状が変つてくることが従来しばしば経験されている (Table 1)。

最近われわれは海水中に加えたアサリ毒は回収し難いことを知り，アサリ毒は食塩によつても変質されるのではないかという疑をもつた[1]。実事そうであるならば貝毒の取扱い上注意すべきことであり，また貝毒の化学構造の究明に一つの手懸りを与えるものと考えこれについて詳細に実験を行た。

Table 1. Deterioration of shell-fish poison, "Venerupin"

Purity of poison (L.D.* mg.)	Treatment	Change in toxicity	Author
0.25	Heated with alcoholic HCl	Detoxified	HATTORI, et al.[2]
1.0	$HgCl_2$	Characteristic symptoms of acute liver atrophy not observed. Time to death unchanged	〃
1.5	Picric acid	Detoxified (90%)	〃
0.1	$KBiI_4$ (DRAGENDORF's reagent)	Time to death shortened	ISHIDATE, et al.[3]

* Lethal dose: Amount of dry matter which contains sufficient poison for killing a mouse of 15g. weight.

実　　験

供試貝毒　昭和28年3月31日浜名湖碇瀬で採集したアサリ肝臓より常法[4]により抽出したアサリ毒エキスで次のような性質のものである。

乾物 66.7 mg/cc，毒力 100≪200 MU/cc，致死量 (LD) 0.33≪0.67 mg。

この毒を簡略のため本文では 100 MU の毒とよぶことにする，従つて例えば "20 MU の毒を加え" とあるのはこの毒エキス 0.2cc を加えることである。

毒の検定　注射液の濃度と注射量をかえて体重 15±1g のマウス3尾の腹腔に注射し，アサリ毒の特異症状（急性肝萎縮症—肝に赤色又は黄色の斑点が現われ，2～6日の間に死ぬ）を以て，2尾を殺した時を陽性の結果とし，それから 15g のマウス1尾を確実に殺すに足りる毒量を算出し，これを単位（マウス単位 MU）として供試液中の毒量を示す。

I. アサリ毒に対する食塩の作用

(A) 汽水及び海水程度の濃度の食塩水からのアサリ毒の回収

実験方法　1, 2, 3% 食塩水夫々 50 cc に，アサリ毒 20 MU を加えた液を，60°C の水浴上送風蒸発乾涸し，析出食塩を充分すり潰し，99% メタノール 20～30 cc を少量宛加えアサリ毒を抽出，抽出液を蒸発シラップを蒸溜水に溶解 2cc となし，常法により生物試験を行つた。もし回収操作中に毒の損失がなければ，各注射液 1cc は 10 MU の毒を含んでいる筈である，しかるに生物試験の結果は Table 2, A 1, A 2, A 3 に示すように，何れの場合も 4 MU に低下していた。一方対照としてアサリ毒に蒸溜水を加えた 0 では毒は完全に回収されている。即ちアサリ毒は汽水，海水程度の食塩水で処理しても明かに毒の損失をおこす。しかし食塩のこの範囲の濃度では毒の損失量に差はない。たとえあつても毒の検定法の誤差範囲内のも

のである。

Table 2. Recovery of the shell-fish poison from NaCl solution

No.	Salt	Concn. of salt (%)	Vol. of soln. (cc.)	Shell-fish poison added(M.U./cc.)	Poison recovered* (M.U./cc.)	Extractant (cc.)	Dry matter in injection (g.)
0	None	0	50 (Dist. water)	20 ≪ 40	10 ≪ 20	99% MeOH 20	
A 1	NaCl	1	50	〃	4 ≪ 10	〃 〃	
A 2	〃	2	〃	〃	〃	〃 〃	
A 3	〃	3	〃	〃	〃	99% MeOH 30	
B 1	〃	30	10	〃	＜2	99% MeOH 15	0.6
B 2	〃	〃	〃	〃	2 ≪ 4	80% EtOH 15	0.8

* Each injection should contain 10 ≪ 20 M.U./cc., if the poison is not affected by the treatment.

(B) 30% 食塩水中からのアサリ毒の回収

高濃度の食塩溶液から毒を回収する場合の毒の損失をみるために 30% 食塩水を用い，A と同様の実験を行つた。この場合は濃縮後多量の食塩中から毒を抽出しなければならない。従つてアサリ毒と食塩に対する溶剤の抽出能力が結果に大きな影響があると考えられるので，溶剤としてメタノールの外 80% エタノールを用いて結果を比較した。

結　果　Table 2, B 1, B 2 に示すように，抽出剤にエタノールを用いてもメタールを用いても，A の場合に比較し著しい毒の損失がみとめられ，一応塩の濃度の影響が明かなようである。但し塩から毒を抽出するために，実験Aでは 20～30 cc のメタノールを，Bではメタノール又はエタノールを 15cc しか用いていない，従つてそのために実験Bでは毒の回収率が小さかつたのではないかという懸念もあるが，生物試験の結果は溶剤の使用量の差に基くよりも大きな差を示しているように思う。この実験で溶剤の量を少くしたのは，A の場合に比し食塩の量が多いので，30cc を用いると抽出される塩の量が著しく多くなり，注射液を作るために再び蒸発，抽出を行わねばならず，それに基く毒の損失を来たす心配があるためである。毒液を加えた食塩溶液を蒸発すると毒液中の不純物のため塩は淡褐色に色づく，溶剤 10cc で処理してもこの色はとれないが 15cc では完全に脱色されるので，毒の抽出も大体完全に行われたと推察される。

(C) 食塩との接触時間の影響

回収操作中アサリ毒が多量の食塩水と蒸発乾涸されることをさけるため，次のような方法によつて食塩との接触時間の長短によつて毒の損失が異るか否かをみた。

実験方法　アンプル中に食塩 1.5 g を入れアサリ毒 20 MU（毒エキス 0.2cc）を加え，対照は直ちに 99% メタノール 20cc で抽出後メタノールを除去し，蒸溜水で 2cc とし，他はアンプルの口を封じそのまま室温 29～32°C で 7 日間放置後先と同様に処理してアサリ毒の回収量をみた。

結　果　Table 3 のごとく食塩にアサリ毒を加え直ちにメタノール抽出した時は 4 MU であるが，7

Table 3. Recovery of the shell-fish poison from saturated NaCl solution

Sample	Expected toxicity of injection (M.U./cc.)	M.U./cc. recovered after storage at 29～30°C. for	
		0 day	7 days
NaCl 1.5 g. + The crude shell-fish poison 0.2 cc. (20 ≪ 40 M.U.)	10 ≪ 20	4 ≪ 10	＜2

The poison was directly extracted with 99% MeOH, MeOH was driven off, and the residue was dissolved in 2cc. of water, and assayed.

日間放置すると毒量は更に ＜2MU に低下する。即ち回収の途中アサリ毒が多量の食塩水と蒸発乾涸されることをさけても，毒を過剰の食塩と接触させると回収される毒の量は減り，接触時間が長くなると損失は増す。

(D) マウス致死量以下の食塩によるアサリ毒の変質

上記一連の実験でアサリ毒を食塩溶液から回収しようとすると毒の損失を来すことは明らかであるが，毒の回収の際には必ず加熱操作が入つている。そこで単に食塩の存在のみで，加熱を受けない場合でも毒の損失が起るか否かをみるため，加えた毒の抽出を行わずそのまま注射液となしうるように食塩の量はマウスに対する致死量以下とした。

実験方法　滅菌した 5% 食塩溶液 0.9cc（食塩 0.045g）及びアサリ毒 10MU（原液 0.1cc）を二組の滅菌アンプルに入れ直ちにアンプルの口を封じ，一組はそのまま室温（23～25°C）に放置，一組はこれを 100°C に 30 分加熱した後放置し，3日及び6日後各組の毒量をしらべた。生物試験に際してはアンプルの内容をそのまま注射液とした。また対照として一つは調製直後のアンプルの内容をそのまま，一つはアンプルの内容を蒸発皿に入れ 60°C の水浴上で送風蒸発乾涸後蒸溜水に溶解 1cc とし滅菌したものを用いた。

結　果　Table 4 に明かなようにごく短時間（1時間以内）しか食塩と接触しない場合は毒力の低下は認められないが，これを加熱すれば 60°C 位でも必ず毒力の低下を来す，また加熱処理を行わなくても，少くとも3日間食塩と接触するとやはり毒の損失がおこる。この場合加熱操作が加わつても，加わらなくても毒の損失は同じであるが，6日間食塩と接触させた場合は，加熱によつて更に毒の損失が加わる，このことは実験Cの結果 (Table 3) と一致する。

Table 4. Deterioration of the shell-fish poison by NaCl of concentration below the lethal dose for a mouse

Sample	Heat treatment of injection	Expected toxicity of injection (M.U./cc.)	M.U./cc. recovered after storage at 23～25°C. for			Remaks
			0 day	3 day	6 day	
Crude shell-fish poison 0.1 cc (10 ≪20) in 0.9 cc. of 5% NaCl soln.(NaCl 0.045g.)	None	10 ≪ 20	10 ≪20	4 ≪10	4 ≪10	The poison was assayed directly with the sample solution without being recovered.
〃	100°C., 30 min.	〃	4 ≪10	〃	＜2	
〃	Dried up at 60°C. and dissolved in H_2O up to 1cc.	〃	〃			

ここに注意すべきは Table 4 の結果は貝毒を致死量以下の食塩と共にマウスに注射してえられたものである。従つて結果にあらわれた毒力の低下又は毒の損失は，食塩による毒成分の変質に基くものでなく，食塩が貝毒に対するマウスの感受性を低下させたためではないかということも一応考えられる。しかしアサリ毒が急性毒でないことを考えればこの懸念はまずあたらない，事実ごく短時間しか食塩と接触させない場合は毒力の低下が全く認められないことは，毒の損失は食塩の変質作用によるものであることを示すものである。

II. 塩の種類による影響の比較

アサリ毒は食塩の存在によつて毒力の損失を示すことが明かになつたので，塩の種類によつてこの作用がどう変るかをみるため，塩化カリ，硫酸ソーダ及び硫酸カリのアサリ毒に及ぼす影響をしらべた。

(A) 低濃度の塩化カリ，硫酸ソーダ及び硫酸カリのアサリ毒に及ぼす影響

実験ＩＡと比較するため食塩，塩化カリ，硫酸ソーダ，硫酸カリの 0.25M 溶液及び食塩，塩化カリの 0.5M 溶液を用い，実験ＩＡと全く同じ条件で処理し毒の検定を行つた。

結　果　Table 5 に示すように塩化物については Na より K の方が毒を変質させる力がつよく，硫酸塩は塩化物よりも作用が大きい。

塩化カリも食塩の場合と同じく 0.5M 以下の濃度では，濃度による影響の差は見られない。

(B) 高濃度の食塩，硫酸カリ及び無水硫酸ソーダのアサリ毒に及ぼす影響

高濃度の塩でアサリ毒を処理ししかもアサリ毒を抽出することなくそのままうすめて注射液となしうるように，次のような実験方法を用いた。

Table 5. Recovery of the shell-fish poison from dilute salt solutions

Salt	Concn. of salt		Vol. of soln. cc.	Shell-fish poison added (M.U./cc.)	Poison recovered (M.U./cc.)	Extractant (cc.)
	M	%				
NaCl	0.25	1.5	50	20 ≪ 40	4 ≪ 10	99% MeOH 30
〃	0.5	2.9	〃	〃	〃	〃 〃
KCl	0.25	1.9	〃	〃	2 ≪ 4	〃 〃
〃	0.5	3.7	〃	〃	〃	〃 〃
Na_2SO_4	0.25	3.5	〃	〃	1 ≪ 2	〃 〃
K_2SO_4	〃	4.3	〃	〃	〃	〃 〃

Each injection should contain 10 ≪ 20 M.U./cc., if the poison is not affected by the treatment.

実験方法　食塩，硫酸カリ及び無水硫酸ソーダ各 0.1g にそれぞれアサリ毒 0.2cc (20 MU) を加えすり潰した後蒸溜水にて溶解 2cc (1cc 中塩類 0.05g 含有) となし，(A) 1cc は直ちに生物試験を行い，(B) 残りの 1cc はアンプルに入れ 100°C 30 分加熱後生物試験を行つた。

結　果　Table 6 に示すように食塩においては A, B とも 4 MU，硫酸ソーダではいづれも 2 MU に低下している。硫酸カリでは加熱しなかつたものは 10 MU でアサリ毒の損失はみられなかつたが，加熱すると 10 MU 以下となる。この場合毒力の下限は求めることができなかつた，これはカリ塩の毒性のため 0.1cc 以上の注射量を試みることができない (15 ± 1g のマウスは注射量 0.5cc で 6 分，0.25cc では 8 分で死亡する) ためである。

Table 6. Recovery of the shell-fish poison from high concentration salt solutions

	Heat treatment of injection	Expected toxicity of injection (M.U./cc.)	M.U./cc.		
			NaCl	K_2SO_4	***Na_2SO_4
A	None	10 ≪ 20	4 ≪ 10	*10 ≪ 20	2 ≪ 4
B	100°C., 30 min.	〃	〃	** < 10	〃

The shell-fish poison (20 ≪ 40 M.U./cc.) was ground with 0.1 g. salt and diluted to 2cc.. The half is immediately and the other is after heating at 100°C. for 30 min. subjected to estimation of poison.

* Mice were killed in rather shorter period (with in 24 hours), but the characteristic symptoms of acute liver atrophy were apparent.

** Owing to toxicity of potassium salt, injection more than 0.1 cc. cannot be used.

*** 4 ≪ 10 M.U./cc. was obtained when the poison was dissolved in sterilized 5% Na_2SO_4 solution and injected.

食塩の場合低濃度の液にアサリ毒を短時間ふれさせただけで加熱しなければ毒は変質しなかつた (実験 I D, Table 4) が，食塩の濃度がきわめて高いこと加熱されなくてもアサリ毒の損失がおこる。一方硫酸ソーダの場合は，滅菌した低濃度（5%）の溶液に毒をとかし直ちに注射しても，明かに毒力の低下がみられる (Table 6 註***)。

高濃度でアサリ毒の毒力を低下させる作用は $Na_2SO_4 > NaCl > K_2SO_4$ の順で，硫酸カリの作用はごく弱い。このことは低濃度の硫酸カリはアサリ毒に対して硫酸ソーダと同程度で，食塩よりもはるかに強い変質作用をもつていることを示した実験 II A の結果 (Table 5) と矛盾するようであるが，必ずしもそうではない。何故ならば Table 5 の場合はアサリ毒を溶液から抽出してから検定しているが，この場合は抽出処理がふくまれていないからである。

尙ここにみられた毒力の低下は貝毒に対する各種塩の変質作用によるものであつて，注射液中の塩の共存

するためにおこるマウスの感受性の低下によるものでないことは，食塩（Table 4）及び硫酸カリ（Table 6, A）については単に注射液中に生物試験に用いた程度の塩が存在するだけでは毒力の変化の見られないことから明かである。

硫酸ソーダについては直接の証明はないが，貝毒が急性毒でないことからやはり同様に考えられる。従つて $Na_2SO_4 > NaCl > K_2SO_4$ なる順位は貝毒に対する各塩の変質作用の大さを示すものといえる。

考　　察

アサリ毒がかなり耐熱性の物質であること—秋葉[4]によると 100°C，3時間；109°C，1時間の加熱にも耐える—はアサリ毒研究の初期からよく知られており，アサリ毒の分離精製に広く利用されてきた。一方中性塩に対する安定性ということは全く考えられもしなかつたが，本実験によると塩の存在の下では著しく熱に対して不安定となり，1% の食塩水と共に 60°C の水浴で加熱しても 6 割の毒の損失をおこす（Table 1）．塩の存在はこのように耐熱性を失わせるばかりでなく，室温でも長時間（3 日）のうちには同様毒の損失をおこす（Table 4）。即ち熱の作用は従であつて塩こそ毒を変質せしめる主役といえる。

海水中に加えられたアサリ毒を回収する際毒の損失をきたすことについて，われわれが初めに考えたことは，回収操作の途中アサリ毒は蒸発乾涸するまで熱せられるので，その間に現われる食塩の脱水作用によるもので，アサリ毒の分子中にラクトンやラクタムの生成に類する変化がおこるのではないかということであつた。然るに毒の損失は食塩の 5% 溶液中常温でもおこる（Table 4）。このことは食塩の濃度が高められる必要はないことを示すと共に，もし塩の脱水作用が原因だとしたら，それは無機イオンの水和性に基くものではないかということを暗示する。しかし食塩よりも水和力の強いイオンからなる硫酸カリが毒に対して事実上影響を与えないという事実（Table 6, A）はそのようなイオンの水和力に基くものということのできないことを示している。

その機作はともあれアサリ毒は中性塩の存在によつてごく簡単に毒の損失を来すという事実は今後アサリ毒を取扱う場合常に念頭におかねばならない重要な事実である。

またアサリ毒の精製操作中に起きる損失について従来その理由の説明に苦しんだ例も多いが，上記の事実によつて説明できるものもあるように思われる。例えばさきにわれわれは安息香酸及びキニーネを吸着媒としてアサリ毒精製を試みた際[5]，安息香酸としてアサリ毒の安息香酸ソーダ溶液に塩酸を加えて析出させたものを用いた場合及び塩酸キニーネから作つたキニーネで処理した場合には毒の損失がおきるが，安息香酸としてアサリ毒液に安息香酸の 99 % エタノール溶液を加えて析出させたものを用いると，毒の損失はおきないことを見出しその説明に苦しんだが，アサリ毒が無機塩によつて毒力の損失を来すという今回の結果からみれば当然のことであろう。即ち安息香酸ソーダを用いた場合は塩酸の添加によつて安息香酸が析出すると共に食塩が生成され，またキニーネの場合は塩酸塩をアルカリで中和しキニーネを遊離させる際食塩が生ずるからである。

摘　　要

1. 食塩溶液からアサリ毒を回収すると著しい毒の損失がおこる。毒の損失は食塩の濃度が 1～3% の時 60%，30% の時は 80% に及ぶ，水溶液の場合には毒の損失はない。

2. 回収の途中アサリ毒を多量の食塩水と蒸発することをさけても，毒を過剰の食塩と接触させると回収される毒の量は減る。接触時間が長くなると損失は増す。

3. 食塩の存在で毒が熱せられることのないように，5% の食塩水に毒をとかしたものをそのまま動物に注射し毒を検定すると，毒が食塩水中にある時間が短いときは毒の損失はみられない。しかしこの溶液を 100°C に 30 分加熱するか，3 日間放置したものでは毒の損失がみられる。

4. 食塩，塩化カリ，硫酸ソーダ，硫酸カリのうすい溶液から毒を回収する際失われる毒量をもつてアサリ毒に対する各塩の影響を比較すると

$$NaCl < KCl < Na_2SO_4,\ K_2SO_4\ .$$

5. アサリ毒を食塩（結晶），硫酸カリ（結晶），硫酸ソーダ（無水物）とすり潰し水でうすめてそのまま毒の検定を行つた結果から各塩の影響を比較すると

$$K_2SO_4 < NaCl < Na_2SO_4$$

となり硫酸カリは殆ど影響がない。

6. 硫酸ソーダは著しい作用を示し，貝毒を5% 溶液にとかして直ちに検定を行つても毒の著しい損失がみられる。

7. 貝毒を塩溶液と共に注射した場合にみられる毒力の低下も，毒に対する塩類の変質作用に基くものでマウスに対する塩の生理的効果とは考えられない。

8. 貝毒を取扱うときは塩の存在によつて毒力の低下する可能性を忘れてはいけない。

終りにこの研究に種々御協力を頂いた静岡県水産試験場浜名湖分場野口博場長，角皆英明技師その他場員の方々及び実験を手伝つて下さつた小淵真澄，押見とめの諸氏に深甚なる謝意を表す。なお本研究費の一部は文部省科学試験研究費によつたものである。

文　　献

1) 右田正男・神名孝一：本誌，**23**，215 (1957).
2) 服部安蔵・秋葉朝一郎：衞生化学，**16**，59 (1949).
3) 石舘守三・萩原治雄：東大立地研報，No. 10，43 (1952).
4) 秋葉朝一郎：日新医，**36**，No. 6，2 (1949).
5) 右田正男・神名孝一・石野あや子：本誌，**22**，424 (1956).